

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЗАЙДЫКОВ

Игорь Юрьевич

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННО-ВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ АЗИАТСКИХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EPISCHURA* FORBES, 1882 (CALANOIDA,
COPEPODA)

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Суханова Любовь Васильевна

Научный консультант:
кандидат биологических наук
Наумова Елена Юрьевна

Иркутск – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1. Виды рода <i>Epischura</i> Forbes, 1882	13
1.1.1. <i>Epischura baikalensis</i> Sars, 1900	16
1.1.2. <i>Epischura chankensis</i> Rylov, 1928	19
1.1.3. <i>Epischura nordenskioldi</i> Lilljeborg, 1889	20
1.2. Описание местообитаний исследуемых видов	21
1.2.1. Геоморфологические особенности, рифтогенез и палеоклимат оз. Байкал	21
1.2.2. Озеро Ханка	23
1.2.3. Пруд Сторс (Storrs Pond)	25
1.3. Молекулярно-генетические методы в исследовании веслоногих ракообразных	25
1.3.1. Маркеры для молекулярно-генетических исследований веслоногих ракообразных	26
1.3.2. Оценка генетико-демографических параметров популяции	28
1.3.3. Модели эволюции и методы построения филогенетических схем.....	31
1.4. Морфологические методы исследования Copepoda	34
1.4.1. Исследование структур интегумента	35
1.4.2. Исследование ротовых конечностей	36
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Сбор образцов.....	38
2.2 Молекулярно-генетические методы.....	40
2.2.1 Выделение ДНК.....	40
2.2.2 Амплификация ДНК	40
2.2.3 Очистка и определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР	43

2.2.4	Обработка молекулярно-генетических данных	43
2.3.	Морфологические методы.....	45
2.3.1	Структуры интегумента <i>E. baikalensis</i>	45
2.3.2.	Исследование ротовых конечностей	47
ГЛАВА 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ	50
3.1.	Анализ нуклеотидных последовательностей	50
3.1.1.	Фрагмент мтДНК COI.....	50
3.1.2.	Фрагмент ядДНК ITS1	64
3.1.3.	Нуклеотидная последовательность рибосомного гена 18S.	66
3.2.	Морфологический анализ.....	66
3.2.1.	Структуры интегумента <i>E. baikalensis</i>	66
3.2.2.	Морфологические исследования ротовых конечностей	70
ГЛАВА 4.	ОБСУЖДЕНИЕ	75
4.1	Молекулярно-генетический анализ.....	75
4.2	Морфологический анализ.....	81
4.2.1.	Структуры интегумента.....	81
4.2.2.	Ротовые конечности.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	90
ПРИЛОЖЕНИЯ	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п. н. – пара нуклеотидов

рДНК – рибосомная дезоксирибонуклеиновая кислота

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФА – флуктуирующая асимметрия

ядДНК – ядерная дезоксирибонуклеиновая кислота

COI – ген первой субъединицы цитохром-оксидазы

Fa – средняя частота асимметричного проявления на признак

ITS1 – Первый внутренний транскрибируемый спейсер рибосомной ДНК, расположенный между последовательностями кодирующими РНК 18S и 5S

TMRCА –Время до ближайшего общего предка (Time to the Most Recent Common Ancestor)

Районы цефалона *E. baikalensis*:

СБ – Соединительный боковой

СЛБ – соединительный левый боковой

СЛС – соединительный левый средний

СПБ – соединительный правый боковой

СПС –соединительный правый средний

СС- соединительный средний

ТБ – торакальный боковой

ТЛБ – торакальный левый боковой

ТЛС – торакальный левый средний

ТПБ – торакальный правый боковой

ТПС – торакальный правый средний

ТС – торакальный средний

ЦС – центральный средний

ЦТ – центральный торакальный

ОА - Общая асимметрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы Планктонные формы ракообразных, составляющие основную массу зоопланктона, играют важную роль в морских и пресноводных экосистемах [Монаков, 1976]. Известно, что веслоногие ракообразные (подкласс *Copepoda*) имеют морское происхождение. Представители морской фауны преобладают почти во всех 10 отрядах этого подкласса [Монченко, 2001].

Отряд *Calanoida*, относящийся к подклассу *Copepoda*, состоит из свободноживущих морских и пресноводных видов. Семейство *Temoridae*, относится к отряду *Calanoida*, его представители обитают в северном полушарии, входят в зоопланктонные сообщества прибрежных морских вод (род *Temora*), эстуарных и солоноватых вод (*Eurytemora*) и пресных вод (*Epischura* и *Heterocope*) [Boxshall & Halsey, 2004], где могут занимать важное место в водном сообществе. Представители рода *Epischura* Forbes, 1882 обитают на территории Азии и Северной Америки, являются хорошей моделью для изучения экологических и генетических различий видов, механизмов расселения и приспособления видов, филогенетических построений, поскольку обитают в различных по размеру, трофности и температурному режиму пресноводных водоемах северного полушария. Встречаются они от небольших и мелководных озер и прудов, это - *Epischura massachusettsensis* и *Epischura nordenskioldi*, и до глубочайшего озера Байкал, где обитает *E. baikalensis*. Естественно, что особенности обитания соответствующим образом отражаются на биологических особенностях организмов.

Разорванность ареалов представителей рода может свидетельствовать о ранее более широком его распространении в пресных водах северного полушария. Актуальным остается вопрос о путях расселения и причинах, приведших к подобному рода разорванности. Центром видообразования рода предлагается считать Северную Америку [Смирнов, 1936], так как там обитает основная масса видов. В данной работе акцент делается на азиатских

представителях рода *Epischura*, а именно *E. baikalensis* и *E. chankensis*, чью общность отмечал еще С.С. Смирнов [1936] предлагая относить обитающие в Азии виды к подроду *Epischurella*, в противоположность американским видам, которые предлагалось относить к подроду *Epischura*. Некоторые современные исследователи обсуждали даже возможность выделения азиатских видов в отдельный род *Epischurella* [Bowman et al., 2019].

Epischura baikalensis Sars, 1900 – эндемик Байкала, обитающий в пелагиали озера в течение всего года. Данный рачок один из главных объектов в питании рыб и хищных беспозвоночных пелагического комплекса – является важнейшим звеном в биотическом круговороте вещества и энергии в Байкале. По некоторым расчетам, в процессе своей жизнедеятельности использует за год около 30% первичной продукции озера [Вотинцев, Афанасьева, 1968; Афанасьева, 1977].

Epischura chankensis Rylov, 1928 – занимает важное место в озере Ханка, где составляет основу зимнего зоопланктона, иногда достигая 100% в его составе. Доля ее в количественном соотношении среди планктонных животных в период открытой воды составляет в среднем 31–37% и от биомассы зоопланктона 45–60% [Барабанщиков, 2001]. Распространен вид так же в бассейне реки Амур и пойменных озерах Амура, встречается в пресных водоемах Китая [Боруцкий и др., 1991]

Популяционная структура вида, процессы скрытого видообразования активно исследуются многими учеными в мире. Благодаря широкому применению молекулярных методов в последние десятилетия в этом вопросе произошла серьезная активизация исследований организмов многих таксономических групп. Сравнительный анализ облика видов и поиск генетических и морфологических маркеров, которые могли бы уточнить систематическое положение видов и степень их родства между собой являются актуальными не только для экологических, но и для таксономических и эволюционных задач. Актуальным остается и поиск методов интегративной оценки воздействия на окружающую среду, в частности на озеро Байкал, что особенно актуально в свете вопроса о глобальных климатических изменениях. *E.*

baikalensis и *E. chankensis* – являются ключевыми представителями планктонных сообществ. Понимание особенностей их жизнедеятельности, популяционной структуры, эволюционной истории будет полезным для дальнейшего моделирования воздействий на экосистемы уникальных озер.

Степень разработанности темы. В настоящее время таксономическая структура и филогенетические отношения веслоногих ракообразных – вопрос дискуссионный [Dussart, Defaye, 2001].

Филогенетические отношения представителей рода *Epischura*, история происхождения были предположены ранее только на основании морфологических признаков [Смирнов, 1936; Боруцкий и др., 1991; Huys, Voxshall 1991; Dussart, Defaye, 2001]. В недавнее время вопрос к систематике и филогении группы начал подниматься вновь, с применением молекулярно–генетического и междисциплинарного подходов [Bowman et al., 2019]. Дискуссионным остается вопрос о наличии популяционной подразделенности *E. baikalensis* внутри озера Байкал [Афанасьева, 1977; Боруцкий и др., 1991, Bowman et al., 2018]. Популяционная структура *E. chankensis* в озере Ханка ранее не рассматривалась. Реконструкций популяционной истории обозначенных видов ранее не проводилось.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – исследование популяционно-видовой структуры и эволюционной истории азиатских представителей рода *Epischura*: *E. baikalensis* и *E. chankensis* с помощью молекулярно-генетических и морфологических методов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Подобрать генетические и морфологические маркеры для анализа внутри- и межвидового полиморфизма.

2. Провести анализ внутривидового и межвидового полиморфизма с использованием морфологических и независимо наследуемых генетических маркеров.

3. Сопоставить результаты молекулярно-генетического и морфологического анализов с эколого-биологическими особенностями исследуемых видов.

4. Провести филогенетические реконструкции и оценить время дивергенции исследуемых видов с применением молекулярных часов.

Научная новизна. Впервые для трех видов рода *Epischura* секвенирована последовательность фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК) первой субъединицы цитохром оксидазы COI, ядерного гена 18S рРНК и межгенного рибосомного спейсера ITS1. Все уникальные последовательности помещены в Gen Bank. С использованием полученных последовательностей проведены популяционно-генетические и филогенетические исследования. На основе уникальных гаплотипов COI определены приблизительные датировки основных филогенетических и демографических событий для *E. baikalensis* и *E. chankensis*. Впервые проведен анализ расположения микроструктур интегумента *E. baikalensis* с применением световой микроскопии, показавший высокий полиморфизм по данному признаку. Изучено строение ротовых конечностей с применением световой и электронной микроскопии, которое показало высокую приспособленность видов к жизни в местах их обитания. Впервые для *E. baikalensis* и *E. chankensis* с помощью приставки рентгеновского микроанализа EDAX к сканирующему электронному микроскопу Quanta 200 определено относительное содержание кремния в коронках вентральных зубов мандибул.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные являются вкладом в развитие комплексных подходов к изучению ключевых видов уникальных водоемов. Уникальные последовательности (всего 101) трех видов *Epischura* внесены в GenBank и систему баркодирования организмов, что особенно актуально для фрагмента COI, который является одним из признанных

молекулярных маркеров для баркодирования организмов. Сконструированы новые видоспецифичные праймеры на фрагмент COI: LCOI *Epischura* (L-TTGGAACCTCTTTATTTACTTGCTG) и HCOI *Epischura* (R-CAAAATAAATGTTGGTATAAAATAG) для *E. baikalensis*, а также LCOI_ECh (L-GGGACAGGGTTAAGGATAAT) и HCOI_ECh (R-TCCAGGGTGACCAAAAATC) для *E. chankensis*. Для фрагмента гена 18S сконструированы универсальные для Calanoida праймеры 18L_323 (L-GTTCGATTCCGGAGAGGGAGC) и 18R_1426 (R-GTGTGCGGCCCAAGAACATCT). Исследование внесло вклад в понимание процессов формирования видов и приспособления к меняющимся условиям обитания. Результаты данной работы могут быть использованы для моделирования последствий антропогенного влияния на водные экосистемы. Полнота информации о структуре и функциях компонентов биоценоза на всех уровнях его организации (в том числе сведения о генетической структуре видов) имеет практическое значение для мониторинга экосистемы, прогнозирования путей ее развития, разработки подходов по снижению антропогенного воздействия и разумного использования ее ресурсов.

Теоретические положения и результаты проведенных исследований использованы при подготовке научно-исследовательских отчетов по темам ЛИН СО РАН «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры» (0345–2014–0002, № гос. регистрации 01201353444) и «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений» (0345–2016–0002, № гос. регистрации АААА-А16-116122110066-1), «Исследования трансформаций состояния водоемов и водотоков Восточной Сибири в сезонных и долговременных аспектах в контексте изменений климата, геологической среды и антропогенных нагрузок» (0279-2021-0005).

Методология и методы диссертационного исследования. Для исследования внутривидового и межвидового генетического полиморфизма, в данной работе, были использованы независимо наследуемые генетические маркеры: определены нуклеотидные последовательности первой субъединицы митохондриального гена цитохром оксидазы (COI), а также ядерного гена кодирующего 18S рРНК и рибосомного спейсера ITS1. Морфологический анализ проводился с использованием методов световой и сканирующей электронной микроскопии, а так же методики просветления и окрашивания интегумента ракообразных. Анализ полиморфизма последовательностей участков ДНК и расположения структур интегумента проводился с использованием современных компьютерных программ. Для проанализированных данных были построены филогенетические деревья, диаграммы, таблицы и графики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Реконструкция филогенетических событий для двух родственных видов веслоногих ракообразных, *E. baikalensis* и *E. chankensis*, являющихся ключевыми видами зоопланктона в местах своего обитания, свидетельствует о продолжительном, не менее 8 млн. лет, существовании представителей рода *Epischura* на территории Азии.

2. *E. baikalensis* представлена в озере единой панмиксной популяцией. В ныне единой популяции *E. chankensis* обнаружены следы некогда существовавшей генетической подразделенности, вероятно возникшей в периоды регрессии озера вследствие образования в его долине изолированных водоемов. Оба вида претерпели в прошлом резкие изменения эффективного размера популяций, соотносимые с климатическими и геологическими изменениями в регионах обитания: появлением в Ханкайской котловине единого водоема и максимальным из зафиксированных на Байкале в среднем плейстоцене оледенений.

3. При исследовании биологии видов рода *Epischura* (Copepoda, Calanoida) целесообразно использовать несколько методов (морфологических, генетических) для выявления особенностей внутривидовой и межвидовой изменчивости.

Степень обоснованности и достоверности полученных данных. Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярно-генетических методов, дополняемых использованием морфологических методов. Применялись актуальные статистические методы обработки данных, в том числе такие, как Байесовский подход. Для подтверждения результатов исследования приведены табличные данные, рисунки, филогенетические деревья, графики и карты.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на международных и российских конференциях: Пятой международной Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2010); II международной научной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Удэ, 2011); Международном рабочем совещании и научной конференции «Исследование биоразнообразия и криптического видообразования у организмов водных экосистем России и Украины с применением баркодинга» (Санкт-Петербург, 2011); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом Конгрессе «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012); XI съезде Гидробиологического общества при РАН (Красноярск, 2014); Шестой Международной Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2015); Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» (Иркутск, 2018 года).

Публикации. Результаты исследования опубликованы в 14 научных работах, из них 7 – статей, 5 из которых в журналах списка ВАК, и 7 – тезисы и материалы конференций.

Личный вклад автора. Диссертационная работа результат исследований автора выполненных в соответствии с планами исследовательских работ в группе эволюционно Генетики ЛИН СО РАН. Автор принимал непосредственное участие в экспедиционных работах, отборе и обработке проб, анализе полученных данных и написании научных статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 110 страницах, содержит 6 таблиц, 22 рисунка и 8 приложений с таблицами. Список литературы включает 207 наименований, из которых 63 российских и 144 зарубежных издания.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю: к.б.н., доценту Л.В. Сухановой и научному консультанту к.б.н. Е.Ю. Наумовой за грамотное руководство, помощь в организации и проведении исследований. Зав. лаборатории Ихтиологии к.б.н. Дзюба Е.В., руководителю группы эволюционной генетики к.б.н. Кирильчику С.В. за ценные замечания и консультации. Зав. лабораторией «Ресурсов континентальных водоемов и рыб эстуарных систем» ТИНРО-Центра к.б.н. Барабанщикову Е.И. за предоставленные образцы *E. chankensis*, доктору Ларри Боуману из Исследовательского института морских ресурсов (Marine Resources Research Institute) в Чарлстоне (Южная Каролина) за предоставленные образцы *E. nordenskioldi*. ЦКП Электронная Микроскопия ЛИН СО РАН. Сотрудникам лаборатории Ихтиологии, иных лабораторий и подразделений ЛИН СО РАН.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Виды рода *Epischura* Forbes, 1882

Род *Epischura* Forbes, 1882 относится к подтипу Crustacea, надкласс Multicrustacea, класс Hexanauplia, подкласс Copepoda, инфракласс Neocopepoda, надотряд Gymnoplea, отряд Calanoida, семейство Temoridae Giesbrecht, 1893 [Walter, Voxshall, 2018].

Представители сем. Temoridae являются обитателями холодных умеренных вод северного полушария [Dussart, Defaye, 2001]. Семейство включает роды *Epischura* Forbes, 1882; *Eurytemora* Giesbrecht, 1881; *Hetercope* Sars, 1863 и *Temora* Baird, 1850. Ранее к данному семейству относили так же род *Temoropia*, но позже его систематический статус был пересмотрен и G.A. Voxshall и S. Halsey [2004] отнесли его к семейству Fosshageniidae Suárez-Morales & Iliffe, 1996.

С недавних пор к данному семейству относят род *Ganchosia* Oliveira, 1946 с единственным видом *Ganchosia littoralis* Oliveira, 1946 и род *Lahmeyeria* Oliveira, 1946 так же с единичным видом *Lahmeyeria turrisphari* Oliveira, 1946, оба обитатели морей [Walter, Voxshall, 2018].

Temora представлены только морскими видами; род *Eurytemora* главным образом солоноватоводными формами; роды *Hetercope* и *Epischura* – преимущественно обитателями континентальных вод.

Род *Epischura* установлен в 1882 году для рачка *Epischura lacustris* Forbes, 1882 обитающего в Великих Американских озерах и в небольших, как правило, стратифицированных озерах Канадского щита. Годом позже, для нового рода описан еще один североамериканский вид *E. fluviatilis* Herrick, 1883, но затем он выделен в самостоятельный род *Lamellipodia* Schmeill, 1897. Некоторым российским авторам род *Lamellipodia* [Боруцкий и др. 1991] представляется сомнительным, тем не менее, он существует в современных таксономических сводках [Dussart, Defaye, 1983], а иные американские авторы все равно определяют его как *Epischura fluviatilis* [Bowman, 1991; <http://www.cnas.missouristate.edu/zooplankton>]. Следующими описаны виды *E.*

nevadensis Lilljeborg, 1889 из озер Британской Колумбии и США (в том числе Аляски) встречающийся от Тихого океана до Скалистых гор и *E. nordenskioldi* Lilljeborg, 1889 из озер Ньюфаундленда, Новой Шотландии, Массачусетса и Северной Каролины. В 1906 описан еще один североамериканский вид *E. massachusettsensis*, Pearse, 1906. Обитает в очень небольших, естественных прудах Дувра и Массачусетса [Humes, 1955], преимущественно в низинах лесов. Помимо описанных видов, к роду *Epischura* могут относиться еще один американский вид *Epischura vagans* Pickering, 1844 [Walter, Voxshall, 2018], изначально определенный из озера Онтарио как *Scopiphora vagans* Pickering, 1844. Таким образом, единого мнения о систематике американских представителей рода так и не сложилось.

Род *Epischura* считался исключительно североамериканским до 1900 г., когда G.O. Sars, по материалам Зоологического музея Российской Академии наук описал *E. baikalensis* Sars, 1900 из озера Байкал. Позже В.М. Рыловым описана эпишура из оз. Ханка на Дальнем Востоке – *E. chankensis* sp. nov. Rylov, 1928. Впоследствии этот вид был найден в пойменных озерах, относящихся к низовью реки Амур, а также в небольшом озере в районе верхнего течения Амура у с. Покровки [Боруцкий, 1961].

Е.В. Боруцкий, в планктонных пробах из Амурского бассейна, нашел еще два вида этого рода. Из оз. Удыль (бассейн Амура) он описал *E. udylensis* Borutzky, 1947 [Боруцкий, 1947], а из озера Чля и в нижнем течении р. Амур у пос. Тыр — *E. smirnovi* Borutzky, 1961, обитающий там вместе с *E. chankensis* [Боруцкий, 1961]. Позже *E. udylensis* из озера Удыль [Боруцкий и др., 1991] был признан идентичным *E. chankensis* Rylov 1928.

Основываясь на некоторых морфологических особенностях и географически обособленных районах обитания С.С. Смирнов [1936] предложил разделить все описанные виды рода *Epischura* на два подрода. Все североамериканские виды отнести к подроду *Epischura*, все азиатские к подроду *Epischurella*. Такое деление, до недавнего времени, поддерживалось преимущественно российскими систематиками, а в мировой таксономической

литературе к подроду *Epischurella* относили исключительно *E. smirnovi* Borutzky, 1961 [Dussart, Defaye, 1983]. Недавние филогенетические исследования представителей рода [Bowman et al., 2019], дали дополнительные данные, свидетельствующие в пользу такого разделения. В последних исследованиях предполагается даже возможность систематического разделения рода не на подроды, а на отдельные роды *Epischura* и *Epischurella*.

Таким образом род *Epischura* включает в себя от четырех до шести американских видов: *E. lacustris*, *E. nevadensis*, *E. nordenskioldi*, *E. massachusettsensis*, возможно *Scopiphora (E.) vagans* и *Lamellipodia (E.) fluviatilis* имеющие спорное таксономическое положение, а также три азиатских: *E. baikalensis*, *E. chankensis*, *E. smirnovi*.

Современный ареал рода *Epischura*, его разорванность могут свидетельствовать о существовавшем ранее более широком распространении его представителей в пресных водах северного полушария, а центром видообразования, возможно, стоит считать Северную Америку [Смирнов, 1936]. В пользу данной гипотезы свидетельствует наличие представителей *Epischura* в оз. Байкал, в оз. Ханка и в озерах бассейна р. Амур. По мнению Е.В. Боруцкого [1947] современные представители рода *Epischura* являются остатком некогда широко распространенной в Северной Америке и Восточной Азии группы, от которой сейчас остались отдельные колонии.

Таким образом азиатскими видами являются: *E. baikalensis*, *E. chankensis* и *E. smirnovi* Borutzky, 1961. Последний вид (*E. smirnovi*), обнаруженный в озере Чля и в нижнем течении р. Амур у пос. Тыр, известен главным образом по литературным данным из работы, в которой и был описан [Боруцкий, 1961]. О его биологии мало что известно, и получить его образцы для исследования не удалось.

1.1.1. *Epischura baikalensis* Sars, 1900

Epischura baikalensis Sars, 1900. Вследствие закравшейся некогда ошибки, в отечественной и некоторой зарубежной литературе, видовое название долгое время писалось как *E. baicalensis*. В исходной публикации G.O. Sars вид описан как «*Epischura baikalensis* G.O. Sars n. sp.» и дабы восстановить историческую справедливость, в современной систематической литературе [Walter, Voxshall, 2018] предлагается вернуться к первоначальному видовому названию.

E. baikalensis – эндемик Байкала, обитающий в пелагиали озера в течение всего года. Является одним из главных объектов в питании рыб и хищных беспозвоночных пелагиали, важнейшим звеном в биотическом круговороте вещества и энергии в Байкале. По некоторым расчетам *E. baikalensis* в ходе своей жизнедеятельности за год может использовать около 30% всей первичной продукции озера [Вотинцев, Афанасьева, 1968; Афанасьева, 1977; 1995].

E. baikalensis – питается избирательно, вылавливая из водной толщи только живые объекты и не улавливая отмершие частички, которые могут поедаться лишь при высокой плотности взвеси последних [Кожова 1953]. Основу рациона составляют диатомовые и перидиниевые водоросли, второе место занимает бактериопланктон [Кожова 1953, 1956; Афанасьева, 1977; 1989; 1995; Коноплева 1983; Наумова, 2004], возможно имеет место питание простейшими [Moore et al., 2019].

Распределение и биология в озере Байкал. Большую часть года *E. baikalensis* обитает преимущественно в верхнем 250-метровом слое воды, где может составлять около 80% численности и 70% биомассы зоопланктона, населяющего водную толщу [Афанасьева, 1977; 1995].

E. baikalensis совершает суточные миграции. С июля по сентябрь в светлое время суток обитает в слое температурного скачка (при температуре от 4 до 6°C): в начале лета в слое 5–10 м, затем по мере прогрева верхних слоев воды – в слое 10–25 м, а в конце августа-сентябре – в слое 25–50 м, где скапливается до 70% численности рачков всего верхнего 50-метрового слоя [Мельник, 1995], но при опускании фитопланктона ниже 50 метрового слоя, вплоть до 200 м., основная

масса эпишуры может устремляться вслед за ним [Makarov et al., 2019]. В темное время суток *E. baikalensis* из занимаемого ею днем слоя поднимается в верхний 5-метровый слой, где достигает высоких концентраций до 0,5 г/ м³ и даже более [Захваткин, 1930; Кожов, 1962; Афанасьева, 1995; Мельник, 1995].

Горизонтальное распределение этого рачка по акватории открытого Байкала рассматривалось многими исследователями [Кожов, 1962; Афанасьева, 1977]. Могут наблюдаться большие различия в численности и процентном соотношении возрастных групп в разные годы и в разных частях Байкала, а также внутри одного года в разные сезоны. Общая численность по годам и котловинам может варьировать от 1 до 13 тыс. экз./м³ [Афанасьева, 1977].

В прибрежных и мелководных районах озера Байкал распределение *Epischura baikalensis* значительно колеблется. В открытых участках Малого Моря *E. baikalensis* является постоянной составляющей зоопланктона, а ее доля может достигать 85% [Вилисова, 1959], в заливах и сорах встречается преимущественно в подледный период и частично весной, после таяния льда. Когда вода в заливах достигает наибольшего прогрева (в июле-августе) она полностью исчезает из состава планктона, изредка сохраняясь лишь в небольших количествах, преимущественно в Баргузинском заливе [Кожов, 1962; Афанасьева, 1989; 1995]. В Посольском соре *E. baikalensis* так же встречается лишь зимой и ранней весной, на значительном расстоянии от Прорвы. По мере уменьшения глубины, уменьшается и количество этих рачков, до полного исчезновения на мелководье. Встречается круглый год в створах Чивыркуйского и Баргузинского заливов, а также в центральной части последнего, так как эти районы находятся под сильным влиянием вод открытого Байкала.

Из Байкала *E. baikalensis* попадает в Ангару и далее по течению в водохранилища, в том числе, и в Братское, где в глубокой приплотинной части нашла подходящие условия для размножения, образовав самовоспроизводящуюся популяцию [Афанасьева, 1995]. Хотя, в более поздние маловодные годы при высокой степени прогрева вод водохранилища *E. baikalensis* в пробах почти не обнаруживалась [Шевелева, Пастухов, 2009; Шевелева и др., 2012]

Размножение и жизненный цикл. У *E. baikalensis* наблюдаются различия в темпах воспроизводства, которые зависят от температурных условий года и возрастного состава поколения [Афанасьева, 1977]. Средняя биомасса в начале лета во всем верхнем 50-метровом слое может меняться в разные годы от 2 до 11 г/м². В период максимального развития *E. baikalensis* –летом и осенью (сентябрь) – биомасса колеблется от 6 до 24 г/м². Темпы воспроизводства близки к другим Calanoida. По некоторым расчетам [Афанасьева, 1995], основанным на многолетних наблюдениях, годовая продукция *E. baikalensis* для всего Байкала (в пересчете на всю пелагиаль) в верхнем 250-метровом слое составляет около 6 млн. т.

У самок *E. baikalensis* формируется один яйцевой мешок, в котором может находиться от 7 до 60 яиц [Афанасьева 1977]. Зачастую они вынашиваются самками до их созревания. Яйцевой мешок самок очень непрочен и при незначительном внешнем воздействии может сбрасываться, разрываясь. После сбрасывания яйца продолжают свое развитие в воде. Одна самка может формировать по 9-10 мешков за жизнь через каждые 10 дней летом и 20 дней зимой.

Е.Ю. Наумовой [2006] было высказано предположение о наличии у *E. baikalensis* покоящихся стадий яиц, обнаруженных у многих морских и пресноводных свободноживущих видов веслоногих ракообразных [Madhupratap et al., 1996; Bron et al., 2011; Holm et al., 2018]. Покоящиеся яйца могут обеспечивать резервный фонд, служащий одним из механизмов популяционной устойчивости *E. baikalensis*. В качестве одного из признаков подтверждающих эту гипотезу рассматривается наличие утолщенной стенки у 95% свободно плавающих яиц, по сравнению с яйцами, находящимися в яйцевых мешках самок.

Процесс развития, как и у всех Calanoida происходит в два периода – науплиальный (личиночный) и копеподитный. Каждый период состоит из 6 стадий; 12-я стадия является половозрелой. Смена возрастных стадий сопровождается линькой. Рачки половозрелой 12-й стадии больше не растут [Афанасьева, 1995].

Основываясь на разнице в размерах рачков, состоянии половых продуктов и наличии двух пиков численности для мелких и крупных рачков Э.Л. Афанасьева [1977] считает, что *E. baikalensis* дает в течении года два поколения: «зимне-весеннее» и «летнее». Подобное же мнение о поколениях встречается ранее у М.М. Кожова [1953; 1962]. Развитие рачков «зимне-весеннего» поколения занимает около 180 суток (с конца декабря по июнь), около 90 суток на развитие науплиальных стадий и примерно столько же на развитие копеподитных. Летнее поколение развивается в более теплых условиях, поэтому, развитие происходит быстрее и занимает около 90 суток (с середины августа по сентябрь) для науплиальных и копеподитных стадий (около 45 суток). Взрослые рачки зимне-весеннего поколения более крупные, чем летнего. Продолжительность жизни особей обоих поколений составляет около года [Афанасьева 1977].

Е.Ю. Наумова [Naumova, Alekseev, 2020] на основе выявленных в один из «не мелозирных» годов четырех пиков численности, делает предположение о возможности *E. baikalensis* давать до четырех поколений за год, а также, что развитие рачка может проходить быстрее (около трех месяцев).

Недавние исследования экспрессии генов показали, что *E. baikalensis* высоко приспособлена к меняющимся условия озера Байкал и в меняющихся пищевых условиях способна активизировать запасание липидов, для переживания менее богатых пищей периодов и обеспечения возможности размножения [Bowman et al., 2017]. Для особей из разных котловин, наблюдалась разница в экспрессии и частотах аллелей генов, связанных с ответом на тепловое воздействие [Bowman et al., 2018], что авторами исследования, так же, интерпретировалось как возможный признак географической подразделенности популяции *E. baikalensis*.

1.1.2 *Epischura chankensis* Rylov, 1928

Epischura chankensis Rylov, 1928 довольно широко распространена в бассейне реки Амур и известна из озера Ханка и пойменных озер Амура, отмечалась в самом Амуре и в южной части Сахалинского залива (Охотское море)

в зоне выноса распресненной воды из Амурского лимана в залив. Данный вид был встречен и в пресных водоемах Китая [Боруцкий и др., 1991; Наумова, 2006].

Практически круглогодично *E. chankensis* в оз. Ханка питается взвесью, состоящей из органики, абсорбированного минерального вещества и бактериальной пленки. Минимальный размер потребляемых частиц у *E. chankensis* составляет 0,3 мкм, максимальный – 12 мкм, эти показатели практически не меняются в зависимости от сезона [Наумова, Барабанщиков, 2008]. Эти условия отличаются от существующих в большинстве пресных водоемов, где наблюдаются значительные сезонные колебания состава и обилия фитопланктона.

E. chankensis составляет основу зимнего зоопланктона озера Ханка и иногда достигает в это время 100% в составе зоопланктона. Средняя биомасса зоопланктона озера в этот период, около 100–200 мг/м³. Доля *E. chankensis* в количественном соотношении среди планктонных животных в период открытой воды составляет в среднем 31–37% биомассы зоопланктона [Барабанщиков, 2001].

1.1.3. *Epischura nordenskioldi* Lilljeborg, 1889

Epischura nordenskioldi Lilljeborg, 1889 встречается в озерах и прудах Ньюфаундленда, Новой Шотландии, Массачусетса и Северной Каролины. Для этого вида известно, что выход из покоя начинается с февраля, и массовый выход науплиусов наблюдается в начале марта. Первые взрослые особи наблюдаются в начале июня. Особи с яйцевыми мешками встречаются с июня по декабрь. Наблюдается два пика численности в марте – апреле и в июне [Hairston, DeStasio, 1988; DeStasio, 1990]. Для небольшого пруда прослежена роль стадии покоя в динамике вида и зоопланктона [DeStasio, 1990]. Есть данные о влиянии сообитания с другими видами на скорость питания [Schulze, Folt, 1989].

Как и другие виды рода, *E. nordenskioldi* сбрасывает яйца непосредственно сразу после их производства, поэтому трудно отслеживать время их откладки и тип яиц. Яйца могут сохраняться жизнеспособными в осадках до трех лет [Hairston, DeStasio, 1988; DeStasio, 1989].

1.2. Описание местообитаний исследуемых видов

1.2.1. Геоморфологические особенности, рифтогенез и палеоклимат оз.

Байкал

Озеро Байкал - самое глубокое (1637 м) и старейшее озеро в мире, расположенное в центральной части Байкальской рифтовой зоны. Делится на три котловины за счет двух поднятий: Бугульдейско-Селенгинской перемычки и Академического хребта (Рис. 1). Южная котловина имеет максимальную глубину 1420 м, Средняя – 1637 м и Северная – 900 м. Основной вклад в водообмен озера вносят ветровые и дрейфовые течения, но из-за поднятий дна примерно 56% всего объема водной массы не участвуют в обмене воды между котловинами [Шимараев и др., 2003].



Рисунок 1. Поперечный батиметрический разрез озера Байкал с юга на север:
<http://www.lin.irk.ru/intas/morphometry.htm>

Озеро имеет довольно длительную историю. Большой и относительно глубоководный бассейн формируется в районе Южной и Средней котловин в интервале 27–10 млн. лет назад. Хотя, неглубокие котловины существовали на месте Байкала и в более ранний период [Мац, Щербаков, 2008]. Считается, что именно со времени формирования глубоководных бассейнов, водная масса озер и населявшие их гидробионты непрерывно преемственно развивались, и какие бы изменения не происходили, всегда оставались рефугиумы, где они сохранялись [Мац и др., 2001]. В позднем миоцене (около 10 млн. л.н.) по

проливу, располагавшемся в центральной части Академического хребта начинается трансгрессия вод из Южно-Средней впадины в Северную [Мац и др., 2001], где формируется другое крупное и глубоководное озеро. На этом этапе существуют две отдельные впадины [Логачев, 2003]. Значительное углубление и разрастание котловин, а также поднятие горного обрамления происходит в т.н. необайкальскую стадию (3,5–0 млн. л.н.). В эту стадию объединяются Южно-Средняя и Северная котловины, а Байкал превращается в ультраглубоководное озеро. Происходят кардинальные изменения климата – от субтропического к умеренному и высокогорному. С 1,8–1,6 млн. лет начинаются периодические оледенения [Карабанов, 1999].

В периоды оледенений формирующиеся горно-долинные ледники концентрируют на себе почти всю свободную влагу, испаряется влага с поверхности озера, уменьшается или совсем прекращается сток из рек за счет снижения количества атмосферных осадков, как следствие уровень озера падает, а также значительно снижается приток биогенов. [Гольдберг и др., 2005]. Таяние же ледников в периоды потепления и сток ледниковых вод в Байкал, приводили к значительному замутнению озерных вод и соответственно сокращению фотической зоны. Похолодания, снижение уровня биогенов, а также уменьшение фотической зоны, вероятно, приводили и к снижению первичной продукции, показателем чего может служить снижение числа или даже отсутствие створок диатомовых водорослей в соответствующих осадочных слоях [Хурсевич и др., 2001].

Пелагиаль глубоководных районов Байкала, несмотря на кажущееся однообразие, не является однородной как по режиму вод, так и по видовым и количественным характеристикам планктона. На основании особенностей распределения температуры воды, воздуха, ветрового режима, характера течений, рельефа прибрежных гор и дна озера, а также стока вся акватория Байкала поделена на пять районов: Южный, Средний, Северный Байкал, Селенгинский район, Ушканий островной район. Кроме того, особо были выделены Мал. Море, Баргузинский и Чивыркуйский заливы [Верболов и др., 1965]. Границы

выделенных районов весьма условны и подвижны. Они меняются в зависимости от сезонной смены факторов среды, их годовых колебаний, а также от метеорологических условий в пределах одного сезона.

1.2.2. Озеро Ханка

Озеро Ханка – самое крупное на Дальнем Востоке России, принадлежит к водосборному бассейну Амура и располагается на севере Приморского края. По акватории озера проходит государственная граница с Китаем, так что небольшая часть озера находится на его территории. Длина озера около 90 км, наибольшая ширина около 67 км, в зависимости от климатических условий, площадь варьирует в районе 4–5 тыс. км². У оз. Ханка сравнительно ровное дно с очень пологим понижением к зоне наибольших глубин [Квасов, 1989]. Глубина озера не превышает 10,5 м, а средняя составляет 4,5 м, преобладают глубины один–три метра [Филимонов, Апонасенко, 2013]. Из озера вытекает река Сунгач, впадающая в реку Уссури и далее в Амур. Приханкайская низменность и, собственно, югозападные берега озера представляют собой заболоченную местность. Питание озера преимущественно дождевое. В среднем сток в озеро составляет 1,99 км³ за год, из озера – 1,7 км³ [Филимонов, Апонасенко, 2013].

Озеро Ханка имеет длительную историю, но в современном облике оно возникло относительно недавно в результате образования на севере Ханкайской котловины «аллювиальной плотины», сформированной наносами рек Уссури и Мулинхе, выше которой образовалось обширное мелководное озеро [Квасов, 1989]. Ханкайская котловина, в которой расположено озеро, представляет собой синклинальный прогиб, в пределах которого на разных этапах кайнозоя возникали озера [Короткий, 2007]. Решающую роль при этом играла разная интенсивность накопления отложений водных потоков, приводящая к образованию плотин [Квасов, 1989].

По-видимому, в начале плейстоцена в Ханкайской котловине озера не было, но существовала развитая речная сеть, связанная с бассейном Палео-Амура [Короткий и др., 1982]. К началу среднего плейстоцена возникли отдельные

неглубокие озера в центральной и северной частях озера, цепочка мелководных озер существовала и по восточному борту Ханкайской котловины [Короткий и др., 2007]. Единый озерный водоем возник в среднем плейстоцене, чему способствовало похолодание климата в шмаковское время – Q2 [Павлюткин, 2004], датируемое приблизительно 300–240 тыс. лет назад [Карта четвертичных образований..., 2013]. Размеры озера на протяжении среднего и позднего плейстоцена и голоцена сильно изменялись. В современных границах оз. Ханка сформировалось около трех тыс. л.н. [Короткий и др., 1982]. Есть спорные мнения, что озеро могло исчезать в начале голоцена [Квасов, 1989; Короткий и др., 2007; Микишин, 2007].

Гидрологический режим озера и распределение зоопланктона. Вода в озере мутная, что объясняется частыми ветрами, приводящими к сильному перемешиванию вод. Наибольшее зарегистрированное содержание взвешенного вещества вблизи берега 167 г/м^3 , а в центре озера при сильных ветрах может достигать 145 г/м^3 , в зимний период постепенно снижается примерно до 10 г/м^3 [Филимонов, Апонасенко, 2013].

После схода льда распределение зоопланктона в озере довольно равномерно, как следствие активного перемешивания сильными ветрами водных масс [Барабанщиков, 2004]. Ближе к лету, по мере прогрева вод и в следствии постоянных направлений ветров, происходит разделение водоёма на зоны имеющие разную плотность планктонных беспозвоночных. Наименьшие концентрации зоопланктона отмечаются в это время в центре озера. Зоопланктонные сообщества центральной зоны пополняются за счёт постоянного выноса животных из южного побережья и заливов. Осенью распределение зоопланктона в озере, в силу ветрового воздействия, вновь становится равномерным, как и весной, за исключением заливов, где количество животных ниже из-за более раннего выхолаживания воды [Барабанщиков, 2004].

Популяции планктонных беспозвоночных озера практически независимы от расположенных ниже по течению водоёмов, включая и р. Амур. Некоторый обмен из нижних участков бассейна Амура с оз. Ханка может осуществляться при

переносе с воздушными массами находящихся в диапаузе покоящихся яиц, либо водоплавающие птицы во время миграций могут переносить их или самих животных на себе и т.п. [Барабанчиков, 2004].

1.2.3. Пруд Сторс (Storrs Pond)

Storrs Pond – небольшой (площадь 0,063 км²) олиготрофный природный водоем на северо-востоке США расположенный в одноименной рекреационной зоне рядом с городом ХанOVER, в округе Грэфтон, штат Нью-Гэмпшир. Пруд отделен плотиной от реки Коннектикут. Средняя глубина 2,6 м, максимальная 6,2 м. Климат этого района умеренно теплый, средняя температура воды в январе (самый холодный месяц) -1°C, в июле (самый теплый) 23,6 °C. В год выпадает около 1030 мм осадков. Температура воды во второй половине лета (в июле – августе) прогревается до 20-25 градусов.

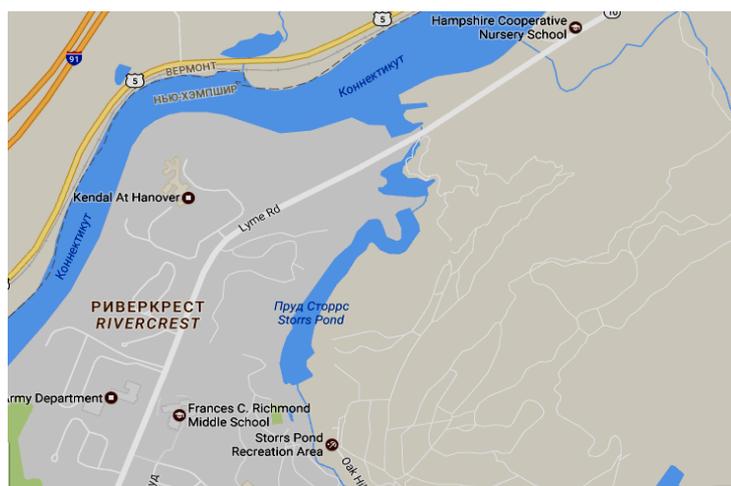


Рисунок 2. Storrs Pond Координаты: 43°43'37" N 72°15'49" W

1.3. Молекулярно-генетические методы в исследовании веслоногих ракообразных

Популяционная структура вида, процессы видообразования активно исследуются многими учеными в мире. Благодаря широкому применению молекулярных методов в последние десятилетия произошла серьезная активизация исследований организмов многих таксономических групп в том числе веслоногих ракообразных (Copepoda) [Bucklin et al., 1998; Burton, 1998; Lee,

2000; Rocha-Olivares et al., 2001; Bucklin et al., 2003; Goetze, 2003; Ki et al., 2009; Figueroa, 2011; Blanco-Bercial et al., 2011., Laakmann et al., 2013; Bradford-Grieve et al., 2014., Sukhikh et al., 2016; Capua et al., 2017 Khodami et al., 2017; Bowman et al., 2019].

1.3.1. Маркеры для молекулярно-генетических исследований веслоногих ракообразных

Митохондриальная ДНК является одним из наиболее популярных молекулярных маркеров. Ее популярность связана с тем, что мтДНК имеет материнскую природу наследования, не участвует в рекомбинационном процессе, обладает высокой скоростью эволюции и значительным внутривидовым полиморфизмом, селективно нейтральной или почти нейтральной природой мутаций, и представлена огромным количеством копий [Абрамсон, 2007]. Эволюционные изменения мтДНК происходят главным образом за счет накопления точечных мутаций, а инсерции и делеции в мтДНК, за исключением некодирующих районов, случаются достаточно редко. У животных скорость эволюции мтДНК в среднем гораздо выше, чем у ядерного генома [Moriyama, Powell, 1997]. Более высокий уровень замен в мтДНК, возможно, обусловлен несовершенством механизмов репарации ДНК, отсутствием белков-гистонов и наличием свободных радикалов кислорода, являющихся побочными продуктами аэробного дыхания, осуществляемого митохондриями [Li, 1997; Lightowers et al., 1997]. Скорость накопления замен мтДНК варьирует у различных организмов в довольно широких пределах, даже между тесно связанными таксонами и составляет, в среднем, 1-2% замен за млн. лет [Brown et al., 1979].

Среди наиболее популярных районов мтДНК для исследований беспозвоночных животных и в том числе веслоногих ракообразных – фрагмент гена первой субъединицы цитохром оксидазы (CO1). Данный район используется для близкородственной филогении и анализа популяционной структуры, к примеру, у видов комплекса *Euritemora affinis* [Winkler et al., 2011; Sukhikh et al., 2016]. Используют его и для анализа более отдаленных филогенетических

взаимоотношений, например, были определены филогенетические взаимоотношения 34 видов, входящих в 10 родов и два семейства подотряда Calanoida (Copepoda) [Bucklin, 2003]. Baek et al. [2016] использовали данный фрагмент для анализа 94 видов корейских Copepoda из 6 отрядов.

Однако использование одной только мтДНК может привести к ошибочным результатам, вследствие амплификации псевдогенов, межвидовой гибридизации и эффекта отбора [Harst, Jiggins, 2005]. Как следствие, в анализе филогенетических взаимоотношений, довольно часто используют COI в сочетании с другими фрагментами, в основном рибосомальной ядДНК [Rocha-Olivares et al., 2001; Bucklin et al., 2003; Goetze, 2003; Ki et al., 2009; Figueroa, 2011; Blanco-Bercial et al., 2011., Laakmann et al., 2013; Bradford-Grieve et al., 2014; Capua et al., 2017; Khodami et al., 2017].

Рибосомные гены. Кодирующие регионы рДНК (18S, 5.8S, 28S) широко используются в качестве молекулярных маркеров для филогенетических исследований копепод на разных таксономических уровнях. Происходит это, поскольку большинство мутаций в данных участках быстро фиксируются в результате согласованной эволюции внутри популяции или вида в процессе расхождения, в то время как межвидовые различия накапливаются [Hillis, Davis, 1988; Hillis, Dixon, 1991]. Внутри вида рДНК свойственна генетическая гомогенность, которая достигается за счет кроссинговера и геной конверсии [Hillis, Dixon, 1991; Odorico, Miller, 1997], а изменчивость обычно ограничивается некодирующими областями, такими как внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) или межгенный спейсер (IGS) [Harris, Crandall, 2000; Reed et al., 2000; Parkin, Butlin, 2004]. Некодирующие области рибосомальной ДНК в силу большой скорости накопления замен, по сравнению с кодирующими регионами рДНК, используют для популяционно-видовых исследований, а также исследования филогении близких видов [Rocha-Olivares, 2001; Goetze, 2003; Ki et al., 2009; Figueroa, 2011; Zagoskin et al., 2014; Capua et al., 2017].

Использование нескольких генетических маркеров, независимых друг от друга, позволяет полнее оценить филогенетические взаимоотношения и популяционно-генетическую структуру видов.

1.3.2 Оценка генетико-демографических параметров популяции

На основе молекулярно-генетических данных можно оценивать генетико-демографические параметры популяции, такие как эффективная численность популяции, генетическое разнообразие популяции, поток генов, и время до ближайшего общего предка. Ряд исследований показали способность эволюционных и демографических событий оставлять след в гаплотипическом и нуклеотидном разнообразии популяций [Rogers and Harpending 1992; Fay, Wu, 2000; Ramos-Onsins, Rozas, 2002; Rozas et al., 2003].

Важными популяционно-генетическими показателями являются: Эффективный размер популяции (N_e), Нуклеотидная изменчивость (обычно обозначается как π), Гаплотипическое разнообразие (Hd).

Эффективный размер популяции (N_e) – это доля особей в популяции, непосредственно участвующих в размножении, а равно и в производстве следующего поколения. Об изменениях N_e в ходе ее эволюции можно судить по таким критериям, как нуклеотидная изменчивость и гаплотипическое разнообразие.

Нуклеотидная изменчивость (π) – средняя доля различий в нуклеотидах между всеми возможными парами последовательностей. Оно определяется как [Nei, Li, 1979]:

$$\pi = \sum_{ij}^q x_i x_j d_{ij}$$

$$\pi = \sum_{ij}^q x_i x_j d_{ij}$$

где q – общее количество аллелей, x_i – частота i -того аллеля и d_{ij} – количество различий в нуклеотидах или заменах на сайт между аллелями i и j .

Гаплотипическое разнообразие (H_d) говорит о количестве и частоте встречаемости различных аллелей в локусе.

$$H_d = 1 - \sum f_i^2,$$

где f_i – частота i -того гаплотипа.

Высокие показатели H_d и π свойственны популяции находящейся в стабильном состоянии с большой и сохраняющейся долгое время эффективной численностью. Высокие показатели H_d и π , также, могут наблюдаться для смешанных выборок особей из различных популяций. Высокие показатели H_d и низкие π могут говорить о том, что имелся быстрый рост численности популяции из популяции с низкой эффективной численностью. При таком резком возрастании численности, по-видимому, было достаточно времени для восстановления разнообразия гаплотипов путем накопления мутаций, но недостаточно для накопления серьезных различий в последовательностях нуклеотидов. Невысокие показатели H_d и π могут свидетельствовать о прохождении популяцией в недавнее геологическое время эффекта «бутылочного горлышка». Низкие показатели H_d и большие π могут являться следствием короткого воздействия «бутылочного горлышка» в большой предковой популяции, в такой ситуации многие гаплотипы исчезают, а нуклеотидное разнообразие остается на высоком уровне. Подобные же показатели H_d и π бывают свойственны смешанным выборкам особей из небольших разделенных географически популяций [Avice, 2000].

Для оценки состояния и истории популяции, в популяционной генетике используется параметр θ – скорость появления мутаций в популяции [Watterson, 1975], который вычисляется формулой:

$$\theta = 4N_e \lambda, \text{ – для диплоидных генов}$$

$$\theta = N_e \lambda, \text{ – для гаплоидных генов,}$$

где λ – скорость возникновения мутации на поколение.

Параметр θ так же определяют через долю сегрегированных (полиморфных) сайтов θ_s (или θ_w) [Watterson, 1975], среднее число попарных различий θ_π , [Tajima, 1983], или величину ожидаемой гетерозиготности θ_H . На использовании,

а также сравнении между собой параметров θ рассчитанных разным способом строится ряд тестов, оценивающих состояние популяции, таких, например, как тест нейтральности: Tajima's D [Tajima, 1989]. Tajima's D тест оценивает разницу между $\theta\pi$ и θ_s , при нейтральном характере эволюционных изменений среднее значение Tajima's D равно нулю. Таким образом, наблюдение значений D со значительным отклонением от нуля может рассматриваться как признак ненейтрального события, такого как отбор или демографическое изменение.

В случае отклонения от нейтрального характера эволюции целесообразно использовать иные тесты для оценки характера демографических событий, такие как например R2 тест [Ramos-Onsins, Rozas, 2002], оценивающий данные на экспансию или резкое увеличение численности популяции. Данный тест оценивает разницу между числом одиночных мутаций и средним числом нуклеотидных различий.

Для того, чтобы оценить популяционную и субпопуляционную генетическую подразделенность применяется статистика Райта F_{ST} [Weir, Cockerham, 1984].

F_{ST} – Это мера генетической подразделенности (дифференциации) популяции. Этот показатель позволяет выявить однородность исследуемой популяции, по конкретному анализируемому локусу. Для анализа множества аллелей Ней [Nei, 1977] был предложен статистический анализ:

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t,$$

где H_t – средняя ожидаемая гетерозиготность во всей популяции, H_s – средняя ожидаемая гетерозиготность внутри отдельной субпопуляции.

Для трактовки показателей F_{ST} Райт [Wright, 1978] предложил следующие градации генетической подразделенности:

- от 0 до 0,05 низкая;
- от 0,05 до 0,15 умеренная;
- от 0,15 до 0,25 значительная;
- >0,25 очень значительная.

Оценка параметров H_d , π , θ и F_{ST} популяций, а также тесты нейтральности, реализуется в ряде компьютерных программ, например, в DnaSP [Rozas et al., 2003].

1.3.3. Модели эволюции и методы построения филогенетических схем

Для анализа нуклеотидных последовательностей веслоногих ракообразных могут использоваться различные математические модели эволюции, которые отличаются сложностью и количеством используемых параметров. Более простые модели включают один или два параметра, более сложные могут содержать их более 60.

Параметры отражают те или иные различия в скоростях накопления замен разных типов нуклеотидов, в частотах нуклеотидов, скоростях транзиций и трансверсий. Так, наиболее простой моделью является однопараметрическая JC69 – модель Джукеса-Кантора [Jukes, Cantor, 1969], которая предполагает, что частота встречаемости нуклеотидов всех типов не отличается. Наиболее обобщенной моделью можно назвать GTR – (General Time-Reversible) [Yang, 1994], которая предполагает разные скорости замещения для каждой пары нуклеотидов, а также предположение о различных частотах появления нуклеотидов. Для этих моделей частоты нуклеотидов оцениваются по наблюдаемым частотам в последовательности. В сущности, JC69, как и многие другие модели, более простые, нежели GTR, такие как K80 Кимуры [Kimura, 1980], F81– Фельзенштейна [Felsenstein, 1981], HKY85 [Hasegawa et al., 1985] – являются частными случаями модели GTR [Bos, Posada, 2005].

Различные участки последовательностей ДНК могут изменяться с различной скоростью, что может быть связано с тем, к примеру, что какой-то участок кодирует активный центр белка и как следствие является более консервативным по сравнению с другими участками. Для того, чтобы скорректировать разные скорости накопления замен в последовательностях используется гамма распределение (G или Γ), а также доля инвариантных сайтов (I) в последовательности – то есть консервативных сайтов, находящихся под

действием отрицательного отбора. Любые модели могут совмещаться с этими дополнительными параметрами G и I, с целью наилучшего филогенетического построения.

Для подбора наилучшей модели замещения и накопления замен могут использоваться различные компьютерные программы, такие как: MrModeltest [Nylander, 2004], Jmodeltest [Posada, 2008] или MEGA [Tamura et al., 2013]. Подбор оптимальной модели осуществляется на основе информационных критериев таких как BIC (Bayesian information criterion) [Schwartz, 1978] или AIC (Akaike information criterion) [Akaike, 1974]. Информационные критерии измеряют ожидаемое расстояние между верной моделью и оцениваемой. Наилучшей является модель с наименьшим количеством необходимых параметров.

Методы построения филогенетических деревьев делятся на две основные группы. Первая группа – дистанционные методы, использующие матрицу генетических расстояний (дистанций) между последовательностями. Вторая группа методов – дискретные методы или символично-ориентированные, учитывают помимо генетических дистанций, сочетание позиций в ДНК, которые подверглись изменениям [Темралеева, 2014].

Дистанционные методы являются наиболее простыми методами филогенетического анализа. К ним относятся такие методы как:

UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean) – невзвешенный попарно-групповой метод [Sneath, Sokal, 1973] предполагает одинаковую и постоянную скорость эволюции для всех сравниваемых таксонов.

WPGMA (weighted pair -group using arithmetic averages) – взвешенный попарно-групповой метод, модификация UPGMA, здесь усреднение дистанции нормируется на полное число таксонов;

NJ (*Neighbor-Joining*,) – метод объединения ближайших соседей [Saitou, Nei, 1987]. Применяют метод для близких таксонов, разошедшихся относительно недавно.

Дискретные методы рассматривают различия между последовательностями в конкретных позициях. Их целью является реконструкция

сценария, наиболее вероятно объясняющего порядок нуклеотидных замещений в эволюционной истории анализируемых групп [Лукашов, 2009].

К дискретным методам относят:

Maximum Parsimony (MP) – максимальной экономии. Изначально разработаны для морфологических признаков [Hennig, 1966]. Уже позже, адаптирован для аминокислотных [Eck, Dayhoff, 1966], а далее нуклеотидных [Fitch, 1971] последовательностей. Строят деревья с наименьшим количеством мутационных шагов, необходимых для организации таксона. Минимизация общей длины дерева достигается изменением топологии ветвей. Является наиболее чувствительным при низком уровне дивергенции таксонов [Miyamoto, Cracraft, 1991].

Maximum Likelihood (ML) – максимального правдоподобия [Felsenstein, 1981], направлены на поиски такого дерева, на котором изменения признаков наиболее правдоподобны с точки зрения эволюционной модели, параметры которой задаются на априорной основе [Павлов, 2005]. Функция правдоподобия вычисляется отдельно для каждой позиции в последовательности, при этом, для всех внутренних узлов конкретной топологии, подсчитываются вероятности нахождения каждого нуклеотида. Таким образом, дерево оптимизирует локально, а не все в целом как в MP методах. Результаты могут находиться в большой зависимости от выбора модели замещения.

Bayesian inference – байесовский метод. Метод оценивает статистическую вероятность гипотезы (апостериорная вероятность) на основе имеющихся данных и некоторого априорного предположения [Лухтанов 2013]. На основе заранее заданных данных, имеющихся нуклеотидных или аминокислотных последовательностей и выбранной модели эволюции строятся деревья, а затем для каждого дерева определяются статистические поддержки в виде апостериорных вероятностей. Затем дерево или деревья с наивысшими показателями статистической поддержки выбираются как наиболее вероятные. Что дает возможность реконструировать филогенетические деревья, имеющие

статистические поддержки в виде апостериорных вероятностей и рассчитать такие поддержки для заданной заранее топологии ветвления [Темралеева, 2014].

Для оценки статистической достоверности филогенетических построений, помимо байесовского метода, используется непараметрический бутстрэп-анализ (bootstrap analysis) [Hedges, 1992]. На основе имеющейся выровненной выборки последовательностей происходит построение новых выборок того же размера, но сайты в них выбраны случайным образом по псевдослучайному алгоритму с возвратом. Такие построения повторяются большое количество раз, формируя несколько наборов последовательностей. Метод может применяться как к дистанционным методам, так и к методу максимального правдоподобия.

Считается [Cummings et al., 2003], что бутстрэп-анализ, является более грубым методом по сравнению с байесовской оценкой апостериорных вероятностей и как правило дает меньшую поддержку для узлов филогенетических деревьев.

1.4. Морфологические методы исследования *Copepoda*

В исследованиях внутривидовой подразделенности перспективно параллельное использование морфологических и молекулярно-генетических подходов [Figueroa, 2011; Havermans et al., 2013; Bradford-Grieve et al., 2014; Capua et al. 2017; Radhika et al., 2017; Kochanova et al, 2018]. В систематических построениях различного уровня информативен анализ расположения пор и других микроструктур экзоскелета артропод [Алексеев, Наумова, 2005].

У копепод интегументальные органы считаются ответственными за внутривидовую коммуникацию, включая распознавание полов и пространственную ориентацию в водной среде [Fleminger, 1973]. Анализ расположения пор и других микроструктур экзоскелета представляет значительный интерес при исследованиях таксономии водных ракообразных и для систематических построений различного уровня [Fleminger, 1973].

Симметричное расположение интегументальных органов, а также значительное их число на сегментах тела ракообразных и в особенности на цефалосоме могут представлять значительный интерес для исследований флюктуирующей асимметрии и филогенетических построений методами кладистики [Layus, Alekseev, 2000].

1.4.1. Исследование структур интегумента

Экспресс метод просветления и окраски экзоскелета копепод. Метод просветления и окраски экзоскелета веслоногих ракообразных разработан В.Р. Алексеевым [Алексеев, Наумова, 2005]. Суть метода заключается в растворении внутренних органов, фиксированных любым образом (формалин, спирт, раствор Люголя, убитых нагреванием) веслоногих ракообразных гипохлоридом натрия, после растворения структуры экзоскелета переносят в каплю воды с водным коллоидом черного анилинового красителя. Окрашивание происходит в капле, помещенной на предметное стекло, нагреваемое открытым пламенем спиртовки или газовой горелки. После окрашивания краситель смывают, а окрашенные структуры изучаются под световым микроскопом с дальнейшим картированием.

С использованием данного метода установлено, что структуры органов интегумента достаточно стабильны и, по-видимому, имеют видовую специфику [Наумова, 2006], а установленная вариабельность в числе пор, сенсилл и их позициях позволяет рекомендовать для анализа при исследованиях флюктуирующей асимметрии, и в кладистике.

Картирование органов интегумента. Для картирования органов интегумента веслоногих ракообразных [Алексеев, Наумова, 2005] предлагается схема, картирующая расположение на цефалосоме секреторирующих и чувствительных структур веслоногих ракообразных. Картирование предполагает условное разделение цефалосомы на 19 сегментов (Рис. 5), за счет деления цефалона на продольные зоны и поперечные сегменты. Центральная (Ц) зона ограничена двумя линиями расстояние между которыми равно основанию роострума. По сторонам от центральной зоны находятся левая (Л) и правая (П)

боковые части, каждая из которых разделяется посередине продольными линиями еще на две зоны срединную (С) и боковую (Б). Поперечные линии координатной сетки проходят параллельно нижней грани цефалосомы и ограничивают сектора. На самом верху расположен одиночный ростральный сегмент (Р), ниже антенальный (А) сектор проходит от головного края на удалении, примерно равном ширине центральной зоны, и достигая наружных границ средних зон, образуя в результате три сегмента АЛС АЦ и АПС. Далее идут еще три сектора максиллярный (М), торакальный (Т) и соединительный (С) отграниченные двумя параллельными линиями, проходящими друг относительно друга на ширине трети оставшейся части. Каждый сектор при пересечении с зонами образует по пять сегментов.

Картируемые структуры, как правило, симметричны относительно оси тела и представлены в одинаковых количествах в правой и левой частях экзоскелета, что придает их расположению определенную закономерность и позволяет сравнивать различных особей одного вида или вести межвидовой анализ [Наумова, 2006]. Отклонения в симметрии расположения билатеральных морфологических признаков, в частности, показатель флуктуирующей асимметрии, позволяет оценивать стабильность развития организмов и является чувствительным индикатором состояния природных популяций [Зорин и др. 2000].

1.4.2. Исследование ротовых конечностей

Морфология ротовых придатков артропод, и ракообразных в частности, актуальна не только для диагностики видов, но и для сравнительных исследований и филогенетических реконструкций [Dahl, Hessler, 1982; Scholtz et al., 1998; Browne, Patel, 2000; Bitsch, Bitsch, 2004]. Многие исследования указывают на значительную связь между пищевым статусом и структурой ротовых частей у копепод [Itoh, 1970; Turner, 1978; Ohtsuka, Onbe, 1991; Romano et al., 1999; Giesecke, Gonzalez, 2004]. В настоящее время стали широко применяться методы, позволяющие применять статистику к параметрам строения

ротовых конечностей.

В 1970 г. Itoh K. описал метод измерения остроты зубов мандибулярных пластинок копепод, который позже был назван «индекс Ито» (Ei). Этот индекс связывал общую ширину мандибулярных пластинок, общую длину расстояния между кончиком и основанием мандибулярных пластинок и общее число зубов. На его основе Ито выделил три группы копепод: фильтрующие травоядные виды характеризовались Ei меньше 500, всеядные виды имели индекс между 500 и 900, и хищные виды имели индекс более 900. Этот метод в дальнейшем использовался рядом ученых [Schnack 1982; Revis et al., 1991; Saito, Kiorboe 2001; Giesecke, Gonzalez, 2004; Bowman et al., 2019].

В работе Норр U. и Маьер G. [2005] был применен показатель «Облавливаемая площадь» (F), (охватываемая максиллипедами площадь). Этот показатель они использовали при сравнении 5 видов взрослых циклопид. Благодаря этому показателю Норр U. и Маьер G. связывали между собой среднюю длину максиллипед и среднюю длину сет, вычисляя среднюю облавливаемую площадь.

Длина конечностей имеет не маловажное значение. Возмущенное поле вокруг движущейся конечности соизмеримо с длиной конечности [Jiang et al., 2002]. Поэтому логично предположить, что удлинение конечности увеличит объем жидкости, захваченной в процессе питания. Длина конечности дает преимущество в хеморецепции, так как хеморецепция происходит в основном при касании [Vanderploeg, Paffenhofer, 1985]. При мелкой и малочисленной пище выгодней длинные конечности и невысокая скорость их движения. При длинной конечности больше площадь захвата и детекции частиц. При крупной и многочисленной пище для осуществления захвата нужны короткие конечности.

Для исследования тонкой морфологии ротовых конечностей, помимо световой микроскопии, эффективно использовать электронную [Felgenhauer, 1987; Ohtsuka, Onb, 1991; Nishida, Ohtsuka, 1996; Ohtsuka, Huys, 2001; Michels, Gorb, 2015], в частности сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), дающую достаточно высокое увеличение.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор образцов

E. baikalensis. Для молекулярно-генетического анализа использовались половозрелые самки *E. baikalensis* с яйцевыми мешками, или без них, из проб отобранных на станциях в Южной, Центральной и Северной котловинах (Рис. 3).

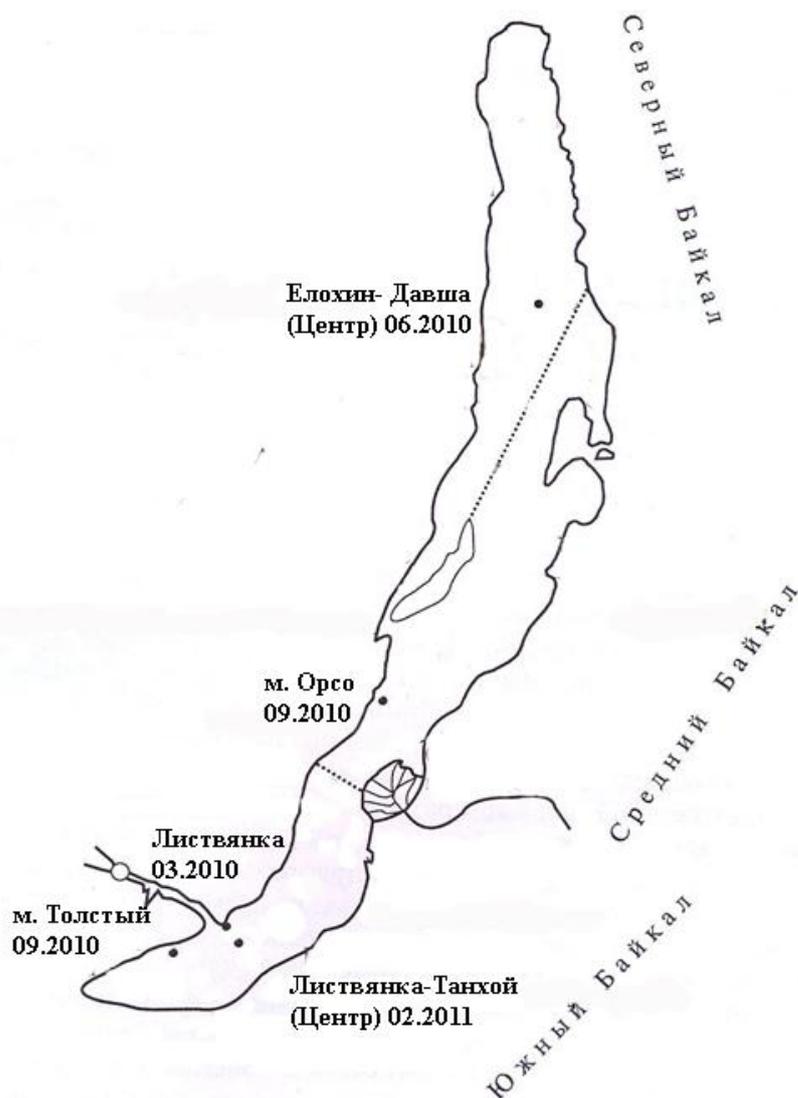


Рисунок 3. Карта отбора проб *E. baikalensis*

Сбор проводился тотальной сетью Джеди Океанической модели (ДжОМ) в сентябре 2010 г. с глубин 400–0 м в Южной (м. Толстый) и 600–0 м в Центральной (м. Орсо) котловинах. Тотальной сетью Джеди с горизонта 50–0 м в

марте 2010 г. Южная котловина (п. Листвянка), в июне 2010 г. Северная котловина (Елохин – Давша ст. Центр), в феврале 2011 г. Южная котловина (Листвянка – Танхой, ст. Центр). Пробы фиксировались в 96 и 70% растворе этанола.

Для исследования интегумента использовались особи, отобранные totally сетью Джеди с горизонта 50–0 м в марте 2010 г. Южная котловина (Листвянка) и в июне 2010 г. Северная котловина (Елохин – Давша ст. Центр).

E. chankensis. Для анализа использовались половозрелые самки из пробы зоопланктона отобранной Е.И. Барабанщиковым (ТИНРО-Центр) в озере Ханка 4.06.2014 напротив базы ТИНРО в с. Камень-Рыболов (Рис. 4). Проба фиксировалась в 96% этаноле. Для исследования тонкой морфологии ротового аппарата использовались пробы из озера Ханка собранные 2003 и 2005 гг. фиксированные 4% формалином, так же предоставленные Е.И. Барабанщиковым.



Рисунок 4. Точка отбора проб *E. chankensis*

E. nordenskioldi. Для анализа использовались самцы и самки из пробы, предоставленной Ларри Боуманом из Йельского Университета, собранной 29 мая 2015 г. в Storrs Pond, Hanover, New Hampshire, USA, фиксированной 96% этанолом.

2.2 Молекулярно-генетические методы

2.2.1 Выделение ДНК

Суммарную ДНК выделяли из яйцевых мешков, или плавательных конечностей особей, фиксированных в 96 и 70% этаноле. Особь выдерживали в течение 10-15 минут в дистиллированной воде, чтобы удалить остатки спирта, и затем отделяли конечности или яйцевые мешки для выделения ДНК. Выделение ДНК из каждого образца проводили в 10 мкл 2-кратного буфера для ПЦР, (32 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 130 mM Трис-НСl pH 8,8 (25°C), 0,2% Tween 20, 0,1 мг/мл), содержащего 2 мкл протеиназы К концентрацией 0,5 мг/мл для выделения ДНК из яйцевых мешков или 2 мкл протеиназы К концентрацией 1 мг/мл для выделения ДНК из плавательных конечностей. Смесь инкубировали при температуре 65°C в течение часа, далее прогревали при 95°C в течение 10 минут для инактивации протеиназы К. Полученный гидролизат использовали для амплификации анализируемых фрагментов ДНК.

2.2.2 Амплификация ДНК

Фрагмент гена первой субъединиц цитохром оксидазы (COI). При амплификации гена COI мтДНК, изначально для всех исследуемых объектов использовали универсальные праймеры LCOI 1490 и HCOI 2158 [Folmer, 1994]. Реакция проходила в присутствии 5 мкМ каждого праймера, 1 мкл Dream-taq или Encyclo-буфера с MgCl_2 , 0,2 mM каждого дНТФ и 0,5 ед. активности Dream-taq или Encyclo-полимеразы (Fermentas), 1 мкл гидролизата, разбавленного предварительно в 10 раз дистиллятом.

Программа амплификации для всех исследуемых объектов состояла из следующих стадий: плавление 94°C – 15сек., отжиг 48–61°C (в зависимости от

температуры плавления используемых праймеров) 15сек., полимеризация 72°C – 60 секунд, 40 циклов. ПЦР реакция проводилась в термоциклерах «MJResearchMJ Research PTC-100», «БИС» и «Bio-RAD T-100». Перед началом ПЦР реакционная смесь прогревалась при 95°C 3 минут, а по окончании последнего цикла выдерживалась при 72°C – 2 минуты.

Для праймеров LCOI 1490 и HCOI 2158 фрагмент ДНК ожидаемого размера (697 пар нуклеотидов – п.н.) для *E. baikalensis* был получен при использовании полимеразы Dream-taq (Fermentas).

На основе полученных с помощью универсальных праймеров последовательностей для *E. baikalensis* были подобраны дополнительные праймеры LCOI Epischura (L-TTGGAACTCTTTATTTACTTGCTG) и HCOI Epischura (R-CAAAATAAATGTTGGTATAAAATAG) [Зайдыков и др., 2015], что позволило получать стабильный продукт амплификации (664 п.н.).

Для праймеров LCOI Epischura и HCOI Epischura в реакции амплификации использовались Encyclo-буфер и Encyclo-полимераза соответственно (в дальнейшем Encyclo-буфер и полимеразы использовались в ПЦР-амплификации всех исследуемых образцов), что так же позволило получать более стабильный продукт амплификации. В программе амплификации для праймеров LCOI Epischura и HCOI Epischura изменилась лишь температура отжига, которая составила 58°C. Во всех случаях перед началом ПЦР реакционная смесь прогревалась при 95°C 3 мин., а по окончании последнего цикла выдерживалась при 72°C – 2 минуты.

Для образцов *E. chankensis* первые последовательности COI, так же, как и для *E. baikalensis*, были получены с использованием универсальных праймеров LCOI 1490 и HCOI 2158. Размер данного фрагмента ДНК у *E. chankensis* составил 671 п.н.

На основе полученных с использованием универсальных праймеров последовательностей COI для *E. chankensis* были подобраны специфичные, внутренние, по отношению к универсальным, праймеры LCOI_ECh (L-GGGACAGGGTTAAGGATAAT) и HCOI_ECh (R-

TCCAGGGGTGACSSAAAAAATC) [Зайдыков и др., 2018], что позволило получать стабильный продукт амплификации.

Для реакции амплификации фрагментов COI *E. chankensis* использовались те же условия, что и для *E. baikalensis*, Encyclo-буфер и полимеразы, температура отжига специфичных праймеров LCOI_ECh и HCOI_ECh составила 57°C.

Для образцов *E. nordenskioldi* все последовательности фрагмента COI были получены с использованием универсальных праймеров LCOI 1490 и HCOI 2158, общий размер полученного фрагмента составил 709 п.н.. Условия реакции амплификации были аналогичны описанным для *E. baikalensis*.

Внутренний транскрибируемый спейсер ITS 1 ядерной рДНК. Для всех исследуемых видов условия ПЦР – амплификации фрагментов ITS1 были аналогичны описанным ранее для реакции амплификации фрагмента COI. В реакции использовались праймеры KP2_F (L-AAAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTGCG) и 5.8S_R (R-AGCTTGGTGCGTTCTTCATCGA) [Sajdak, Phillips, 1997], имевшие температуру отжига = 55°C. Длина анализируемого фрагмента составила: для *E. baikalensis* 303 п.н., для *E. chankensis* 306 п.н., для *E. nordenskioldi* 312 п.н..

Ген рибосомальной РНК 18S ядерной ДНК. Для амплификации гена 18S использовали универсальные праймеры 18A1 и 1800 [Raupach, 2009]. Температура отжига = 60°C. Но после секвенирования последовательностей с обоих праймеров качество центрального фрагмента гена оказалось неудовлетворительным. Для решения данной проблемы, на основе уже полученных последовательностей и нескольких последовательностей гена 18S калянид полученных из Ген Банка, были выбраны внутри гена консервативные участки и на их основе подобраны внутренние универсальные (по крайней мере для калянид) праймеры 18L_323 5'-GTTCGATTCCGGAGAGGGAGC-3' и 18R_1426 5'-GTGTGCGGCCCAACAATCT-3'. Температура отжига для этой пары праймеров = 64°C. Длина фрагмента для новых праймеров составила около 1100 п.н. В дальнейшем, полную последовательность гена 18S получали путем совмещения последовательностей, полученных с двух пар праймеров.

2.2.3 Очистка и определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР

Продукт ПЦР-амплификации визуализировали в 0,8% агарозном геле с добавлением бромистого этидия под УФ излучением, предварительно разгоняя продукт с помощью гель-электрофореза в 0,5 кратном TBE-буфере при V 90–110 в течении 30 минут.

Очистку ампликонов проводили с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей фирмы «Евроген», или с помощью гель-электрофореза в 0,5 кратном TA или TAE буфере (pH=8,0) при V 60–70 в течении часа. Кусочки, содержащие ампликоны, вырезали из 0,6% агарозного геля, замораживали при -20°C , оттаивали и центрифугировали 10 минут при 12000 g. Полученный элюат использовали в реакции секвенирования. Обе цепи секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) с Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems, USA) в Центре Секвенирования ДНК Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия, <http://sequest.niboch.nsc.ru>).

2.2.4 Обработка молекулярно-генетических данных

Предварительный анализ нуклеотидных последовательностей, расчет уровней нуклеотидной изменчивости (π) и индексов разнообразия гаплотипов (H_d), а также значения F_{ST} [Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984] отражающие степень подразделенности видов, подсчитывали с помощью программы DnaSP 5.1 [Rozas et al., 2003].

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы ClustalW вложенной в программу MEGA 6 [Tamura et al., 2013]. Для анализа последовательностей и расчета попарных генетических расстояний так же использовалась программа MEGA 6.

Построение медианной сети гаплотипов проводили программой NETWORK 4.6 [Bandelt et al., 1999], с применением алгоритма объединения медиан («median joining»). Анализ распределения попарных различий между выявленными

гаплотипами мтДНК проводился с помощью программы DNA SP 5.1 [Librado, Rozas, 2009].

Проверка насыщения третьих позиций кодона последовательностей COI нуклеотидными заменами в наборе данных выполнялась с помощью теста [Xia et al., 2003] в программе Dambе v.6.4. [Xia, Lemey, 2009].

Выбор наиболее оптимальной модели эволюции ДНК для филогении проводился с помощью байесовского информационного критерия (BIC) в программе Jmodeltest-2.1.7 [Darriba et al., 2012] или MEGA 6.

Реконструкция филогенетического древа проводилась на основе уникальных гаплотипов COI с помощью Байесовского метода с молекулярными часами в пакете программ BEAST v. 1.8.4 [Drummond, Rambaut, 2007]. Для анализа использовались следующие эволюционные видообразовательные модели: yule process [Gernhard, 2008] with strict clock, yule process with uncorrelated lognormal relaxed clock [Drummond et al., 2006], birth-death process [Gernhard, 2008] with strict clock, и birth-death process with uncorrelated lognormal relaxed clock. Выбор в пользу, какой -либо из эволюционных моделей проводился сравнением показателей правдоподобия в программе Tracer v1.6.

Для датирования филогенетического древа на основе уникальных гаплотипов COI использовалась скорость накопления замен в 1,7% за миллион лет, рассчитанная для эндемичной байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* [Букин и др., 2018]. Скорость эволюции в 1.7% за миллион лет близка к значениям, полученным для раков-щелкунов рода *Alpheus* (snapping shrimp in the genus *Alpheus*) [Knowlton, Weight, 1998] и Ямайских крабов семейства Grapsidae (Jamaican crabs of the family Grapsidae) [Schubart et al., 1998], которые обычно используют для копепод. Скорости, рассчитанные для байкальских амфипод, в нашем случае, более актуальны, в силу большей близости условий обитания последних исследуемым организмам.

Для реконструкции истории изменения эффективного размера популяции использовался метод Байесовского скайплота (Bayesian Skyline Plot) [Drummond, et al., 2005] реализованный с помощью программы BEAST v1.8.4. При проведении

расчетов использовались строгие молекулярные часы (strict molecular clock) и та же самая модель эволюции ДНК, что и при филогенетическом анализе. Калибровка TMRCA популяций в Байесовском скайплоте проводилась на основе результатов филогенетического анализа.

Для каждой из анализируемых популяций исследуемых видов рода *Epischura* в программе DNAsp 5.10 [Librado, Rozas, 2009] были рассчитаны параметры θ_π обозначаемые в программе через «k» – среднее число попарных различий (не совпадающих нуклеотидов) между сравниваемыми последовательностями и θ_s обозначаемый в программе как «Theta (per sequence) from S, Theta-W» - вычисляемый как число полиморфных сайтов на последовательность. Для определения эволюционных механизмов, приводящих к формированию наблюдаемого генетического разнообразия в популяциях использованы Tajima's D – тест [Tajima, F. 1989] – проверка на нейтральный характер накопления замен в популяции и R2 – тест [Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. 2002] – проверка на экспансию или резкое увеличение численности популяции.

2.3. Морфологические методы

2.3.1 Структуры интегумента *E. baikalensis*

Для данного исследования использовались самки из проб, отобранных на центральных станциях разрезов Елохин - Давша (Северный Байкал) и Листвянка – Танхой (Южный Байкал) в начале июня 2010 года с горизонта 50–0 м сетью Джели. Фиксированные 4 % формальдегидом препараты, для анализа поверхностных структур окрашивались анилиновым красителем по методике просветления и окраски хитинового экзоскелета копепод, разработанной В.Р. Алексеевым [2005]. Далее подсчитывалось количество пор и шипиков на поделенном на секторы цефалоне, для удобства их идентификации (Рисунок 5). Исследовано 27 экз. из Южного Байкала и 29 экз. – из Северного Байкала. Для анализа использовали 6 пар участков, расположенных слева и справа от центральной зоны цефалона: по два участка на максиллярном, торакальном и соединительном секторах. Структуры на центральной зоне не учитывались при

анализе асимметрии, но учитывались при сравнении выборок по общему количеству структур. Анализ данных проводили с помощью языка для программирования R с использованием пакетов outliers, stats, ggplot2 [Kostma, 2006; R Core Team, 2020; Wichard, 2009]. Нормальность распределения определяли тестом Шапиро-Уилка [Shapiro, Wilk, 1965] более подходящим для небольших выборок с $n < 30$, дисперсию для нормальных выборок определяли F-критерием Фишера, дальнейший анализ нормальных выборок с заданной дисперсией проводили по T-критерию Стьюдента. Выборки, не подчиняющиеся нормальному закону распределения, анализировались U-критерием Уилкоксона – Манна – Уитни [Mann, Whitney, 1947]. Выбросы для распределений, не подчиняющихся нормальному закону определяли с помощью Фильтра Хампеля [Hampel, 1974], для подчиняющихся нормальному распределению Тестом Граббса [Grubbs, 1969].

Флуктуирующая асимметрия (ФА) оценивалась по следующим показателям: 1) доля асимметричных особей в выборке, 2) доля особей по числу асимметричных признаков от общего числа асимметричных рачков в выборке, 3) доля асимметричных особей по каждому из признаков. Поскольку отдельные особи могут быть асимметричными не только по одному, но и по нескольким признакам, первый показатель, на наш взгляд, оценивает уровень ФА не очень объективно, как правило, занижая его. Поэтому для интегрирующей оценки ФА по нескольким признакам был применен и такой показатель, как 4) Средняя частота асимметричного проявления на признак $F_a = A/n$, где A – средняя арифметическая числа асимметричных признаков у каждой особи; n – число применяемых признаков [Захаров и др., 2000]. 5) Для сравнения уровня асимметрии между выборками также использовалась общая асимметрия (ОА) по боковым и средним районам торакального и соединительного секторов, которая представляла разность между количеством структур в левой и правой части цефалона.

Помимо показателей ФА, между выборками проведено статистическое сравнение количества структур цефалона в целом и по секторам в отдельности.

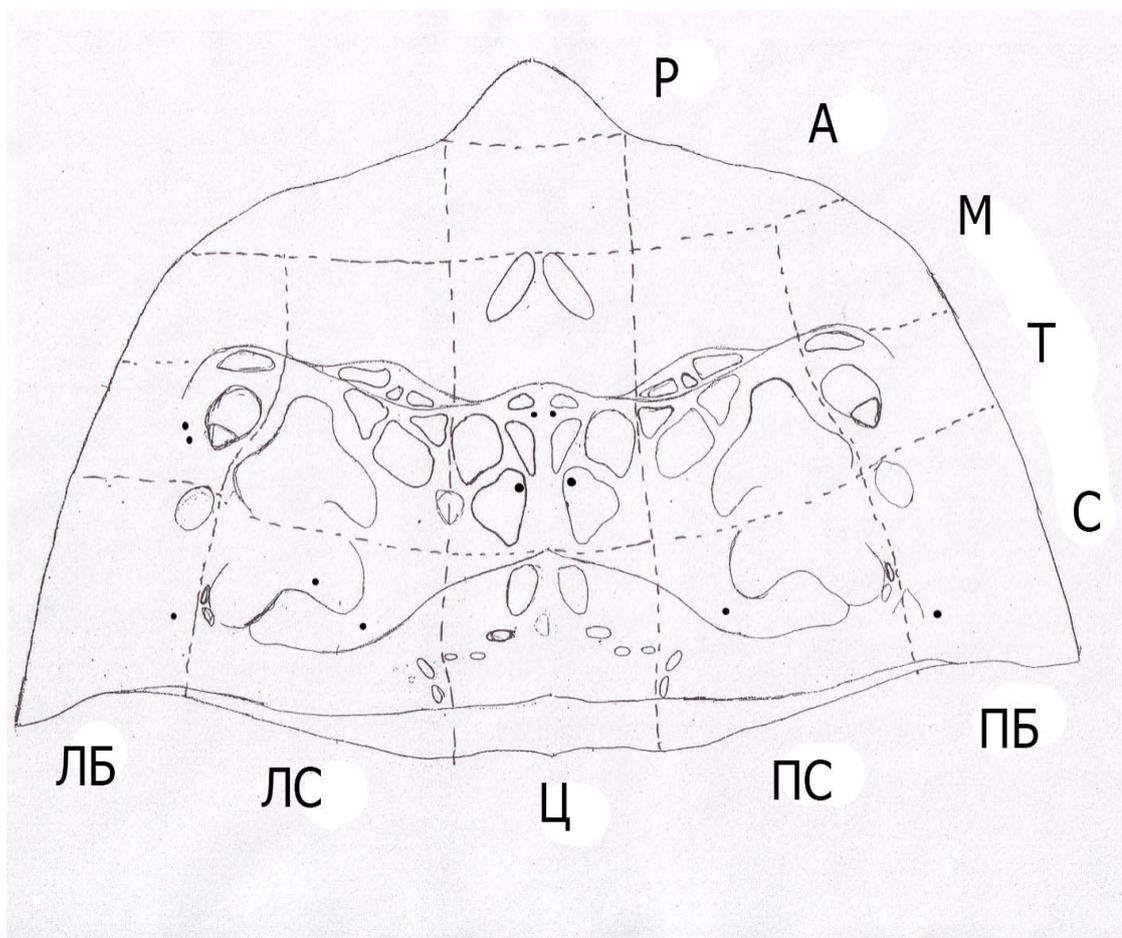


Рисунок 5. Схема цефалона *E. baikalensis*. Жирными точками обозначены поры. Буквами обозначены районы цефалона, по вертикали: Р – рострум, А – антенальный, М – мандибулярный, Т – торакальный, С – соединительный; по горизонтали: ЛБ – левый боковой, ЛС – левый средний, Ц – центральный, ПС – правый средний, ПБ – правый боковой.

2.3.2. Исследование ротовых конечностей

Для исследования при помощи электронного сканирующего микроскопа (СЭМ) QUANTA 200 фирмы FEI образцы отмывались в дистиллированной воде. Далее ротовые конечности отделялись с помощью препаровальных игл и помещались на фильтр, сушились сменой спиртов (30, 50, 70 и 96%), а остатки спирта удалялись с помощью гексаметилдисилазана [Laforsch, Tollrian, 2000], после чего напылялись золотом. Препараты мандибул приготавливались двумя способами. В первом случае так же, как описано выше, или же мандибулы на фильтре сушили в сушильном шкафу при 40°C в течение суток [Наумова, 2006], после чего

напыляли золотом в вакуумной установке SCD 004 (BALZERS). Элементный состав образцов определяли с помощью приставки рентгеновского микроанализа EDAX к СЭМ Quanta 200. На каждой мандибуле *E. baikalensis* определяли содержание элементов не менее чем в пяти точках на вентральном зубце и в центре мандибулярной пластинки для контроля, у *E. chankensis* определяли среднее значение для двух вентральных зубцов, в которых обнаруживался кремний (Si). Процентное содержание Si определяли от доли всех элементов (от В до U), используя программные опции Genesis Spectrum EDAX-приставки. Измерения объектов на СЭМ фотографиях проводили с использованием программы Image Pro 4.

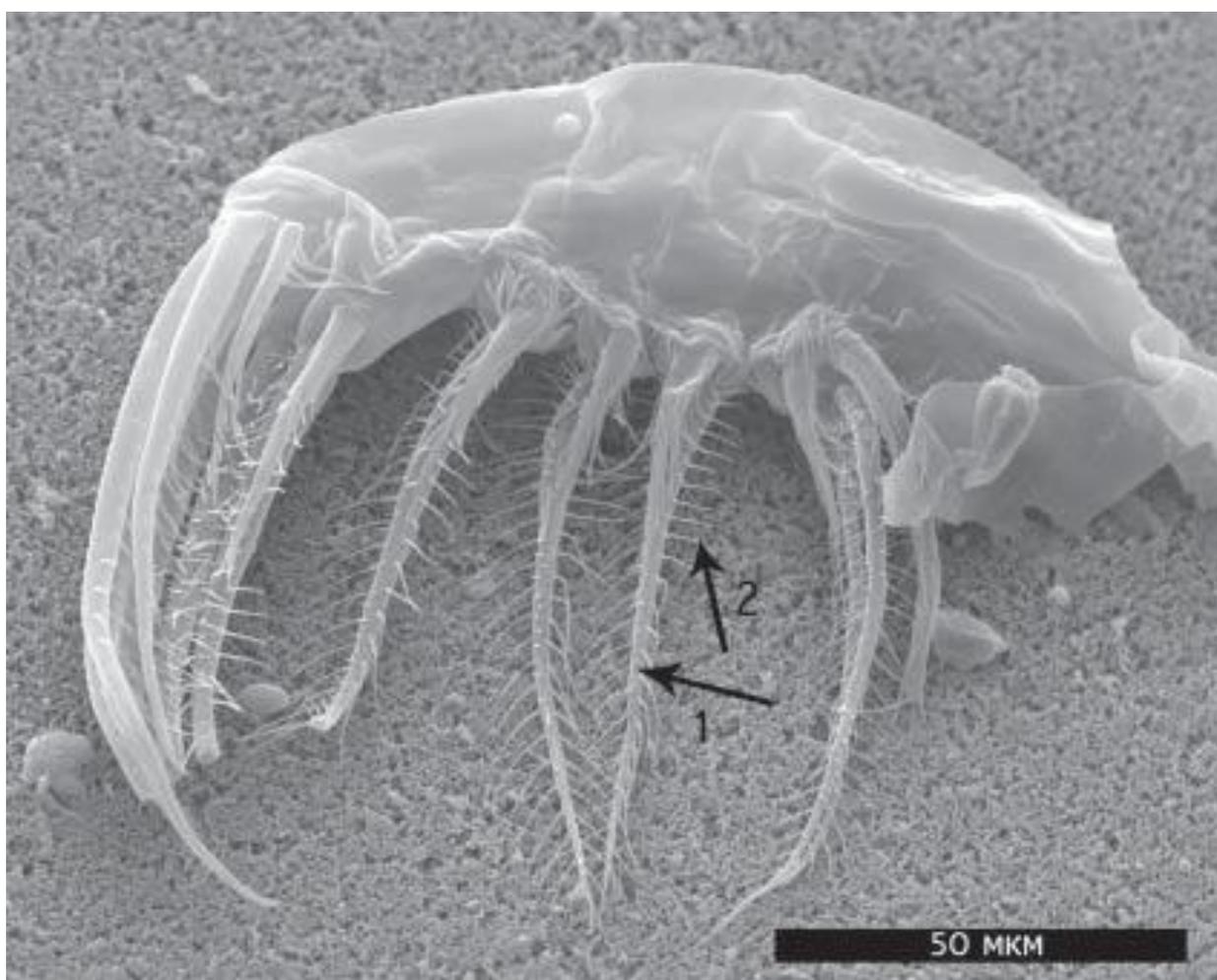


Рисунок 6. Общий вид максиллы *Epischura chankensis*. Стрелками показаны: 1 – сета, 2 – сетула.

При приготовлении препаратов для светового микроскопа отпрепарированные мандибулы помещались в глицерин. Общая длина тела самок измерялась с помощью окуляр-микрометра под световым микроскопом. Измерения метрических параметров ротовых конечностей проводились по фотографиям, полученным на СЭМ, с использованием программы Image-Pro 4.0

Площадь облова вычислялась по методу, приведенному в работе Хоппа и Майра [Hopp, Maier, 2005], как произведение $F = L_{mx} \times L_{sx} \times 2$, где L_{mx} – средняя длина максилл, L_{sx} – средняя длина сет (Рис.6).

Полученные данные промеров обрабатывались с помощью статистического пакета Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ нуклеотидных последовательностей

3.1.1. Фрагмент мтДНК COI

E. baikalensis. Получено 60 последовательностей фрагмента гена COI которые были добавлены в GenBank под номерами KC683830–KC683889 [Зайдыков и др., 2015]. При выравнивании общая длина фрагментов, исключая недостающие данные, составила 566 п.н. Анализ выявил наличие 65 переменных позиций в исследуемом фрагменте мтДНК, из которых каждая пятая в первой позиции кодона. В общем 32 позиции являются филогенетически информативными. Трансверсии были замечены в 9 позициях. Соотношение транзиций/трансверсий равно 4,7. Все замены являются синонимичными и расположены в 1 и 3 позициях кодона.

Средняя величина дивергенции последовательностей мтДНК для всех 60 исследованных особей составила 1% замен нуклеотидов на сайт. Это значение близко к среднему значению дивергенции (0,9%) рассчитанному исходя из значений, полученных отдельно по каждой котловине. В выборке были уникальны 54 из 60 гаплотипов, три гаплотипа были обнаружены дважды. Гаплотипическое разнообразие составило 0,998.

Построен график попарных различий (Рис.7) называемый так же mismatch distribution, выявивший пик в области 5 попарных различий. На графике наблюдается унимодальное логнормальное распределение.

Tajima's D – тест [Tajima, 1989] показал достоверно отрицательные значения D статистики (Таблица1), свидетельствующие об экспансии (резком возрастании численности), либо воздействии движущего отбора. Результаты R2 - теста [Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. 2002] (Таблица1) подтвердили достоверное отклонение от нейтральности ($P < 0.05$) в пользу гипотезы популяционной экспансии.

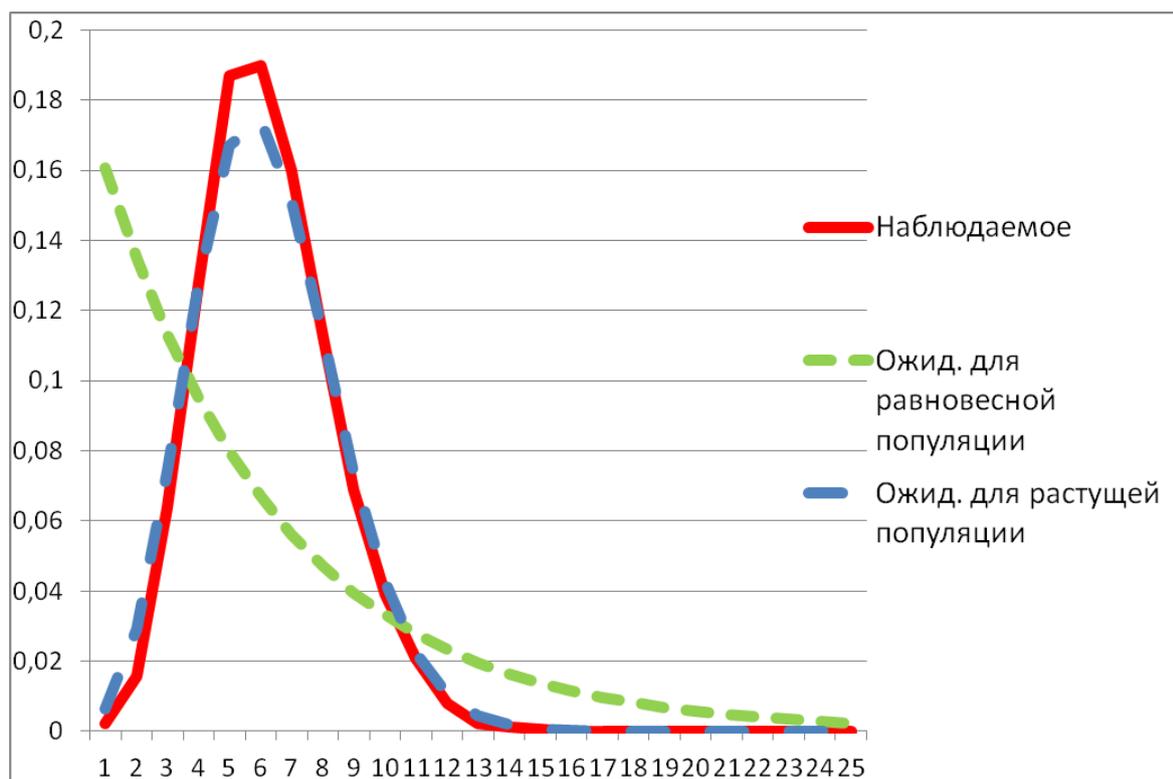


Рисунок. 7. График распределения частот значений попарных различий (mismatch distribution) гаплотипов мтДНК *E. baikalensis* (программа DNAsp 5.1).

Таблица 1. Результаты популяционно-генетического анализа по фрагменту мтДНК COI для двух видов рода *Epischura*.

Название группы	Количество последовательностей	Количество гаплотипов	TMRCA строгие часы	θ_π	θ_s	Tajima's D test	R2 test
<i>E. baikalensis</i>	60	56	0,36 (0,19 – 0,95)	5,21	13,2 9	D=-2,07 P_value=0,016	R=0,034 P_value=0,00
<i>E. chankensis</i> Группа 1	38	30	0,63 (0,40 – 1,00)	2,92	8,56	D=-2,31 P_value=0,00	R=0,028 P_value=0,00
<i>E. chankensis</i> Группа 2	13	13	0,42 (0,24 – 0,80)	4,29	6,44	D=-1,42 P_value=0,15	-

Построенные в BEAST 1.10 графики, реконструирующие историю изменения эффективного размера популяции (Рис. 8) методом Байесовского скайплота (Bayesian Skyline Plot) [Drummond et al., 2005], позволили визуализировать демографические изменения, протекавшие в популяции *E. baikalensis*. Применение молекулярных датировок позволило определить приблизительное время резкого возрастания численности рачка в озере. Период роста эффективной численности датируется 0,18 - 0,1 млн. лет, после чего популяция *E. baikalensis* достигает своего максимума и уже остается стабильно высокой [Zaidykov et al., 2020].

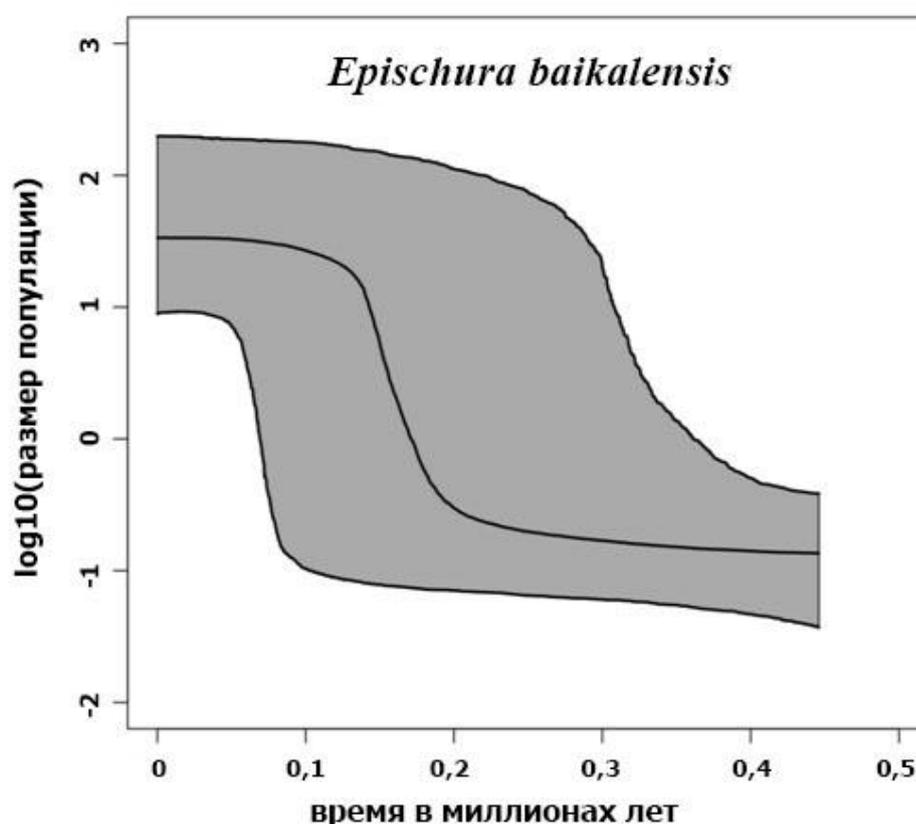


Рисунок 8. Результаты реконструкции истории изменения эффективной численности популяции *E. baikalensis* с помощью Bayesian Skyline Plot. Серая область на графике показывает 95% доверительный интервал для оцениваемой эффективной численности популяции. Промежуточная кривая - медианное значение для эффективного размера популяции.

Для проверки наличия/отсутствия популяционной подразделенности *E.baikalensis* в озере Байкал были построены медианные сети гаплотипов в программе NETWORK 5 с использованием алгоритма «median-joining» [Bandelt et al., 1999]. На первой построенной медианной сети сравнили гаплотипы особей из разных котловин (Рис. 9).

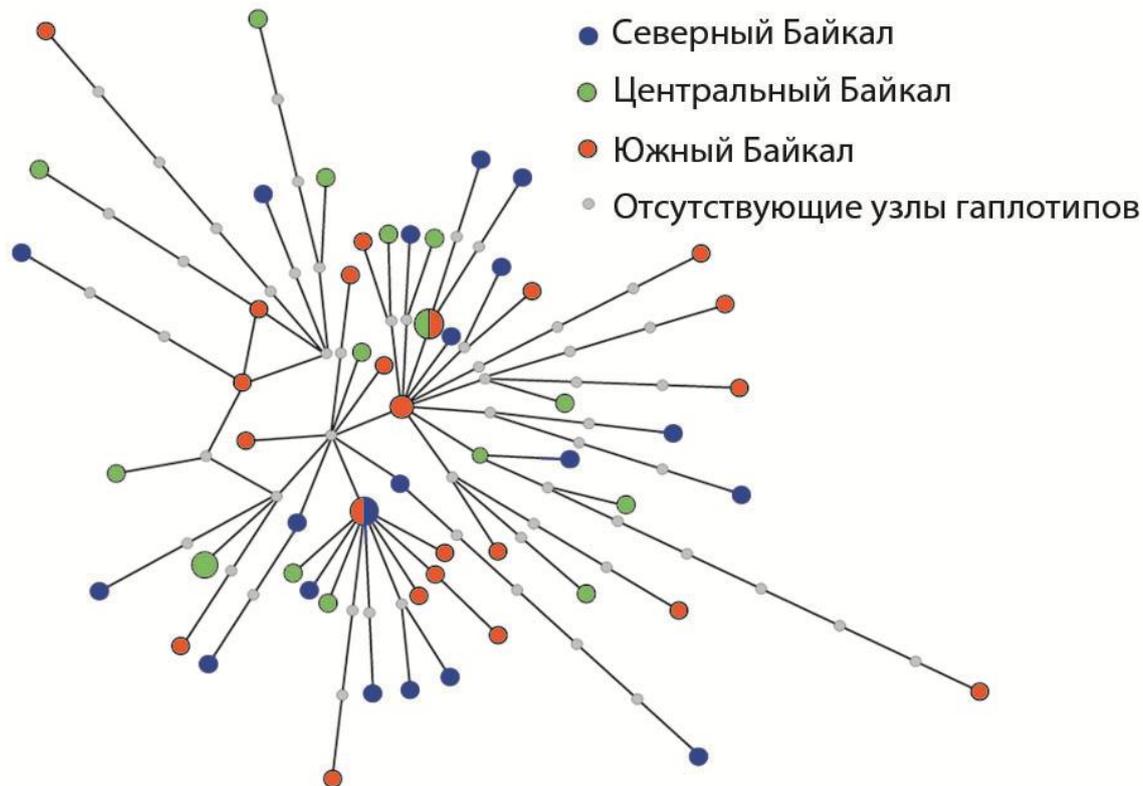


Рисунок 9. Сеть гаплотипов. Цветом показаны особи *E. baikalensis* из разных районов озера Байкал.

На другой медианной сети (Рис. 10) сравнили особи из разных генераций (летней и зимне-весенней). На построенных сетях гаплотипов не наблюдалось никакой популяционной подразделенности по котловинам или генерациям.

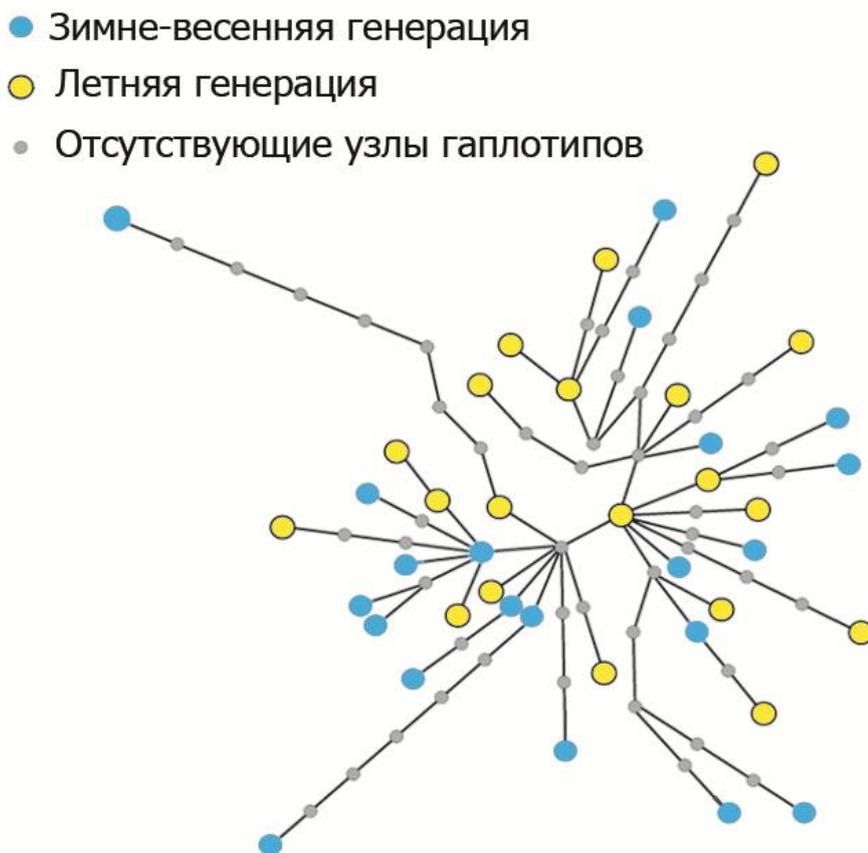


Рисунок 10. Сеть гаплотипов. Цветом отображены генерации *E. baikalensis*.

В качестве еще одного инструмента для проверки генетической подразделенности на основе фрагмента COI в программе DnaSP 5.1 рассчитаны значения меры генетической дифференциации F_{st} (Таблица 2). Значения F_{st} рассчитывались между котловинами попарно, а также между летней и зимне-весенней генерациями. Во всех случаях показатели F_{st} были значительно ниже 0,05, что говорит в пользу отсутствия или крайне низкого уровня подразделенности между котловинами или генерациями.

Таблица 2. Результаты вычисления меры генетической дифференциации для гаплотипов F_{st} из разных котловин озера Байкал и для разных генераций *E.*

baikalensis.

Районы Бакала		F_{st}
Центр	Юг	0,00038
Центр	Север	0,00119
Север	Юг	0,00012
Генерации <i>E. baikalensis</i>		
Зимне-весенняя	Летняя	0,00124

E. chankensis. Фрагмент нуклеотидной последовательности гена COI размером 547 п.н. определен для 52 образцов *E. chankensis* (помещены в GenBank под номерами: KR704356–KR704407) [Зайдыков и др., 2018]. Анализ последовательностей *E. chankensis* по COI выявил 49 переменных позиции, среди которых четыре находились в первом положении кодона. В общей сложности 21 позиция была филогенетически информативна. Трансверсии обнаружены в 11 позициях. В двух последовательностях было обнаружено по одной несинонимичной замене. В единственном числе был представлен 41 гаплотип от 52 особей, один гаплотип встречен у 7 особей и еще два гаплотипа были представлены дважды. Гаплотипическое (H_d) и нуклеотидное (p) разнообразие составило 0,982 и 0,009 соответственно.

Для *E. chankensis* были построены медианные сети гаплотипов в программе NETWORK 4.6 [Bandelt et al., 1999], с использованием алгоритма «median-joining» (Рис.11). В построенной сети гаплотипов выделяется одна группа, представленная большинством гаплотипов и имеющая четкую звездообразную структуру, здесь, от центрального гаплотипа, выявленного у семи особей, на 1–3 шага отходят производные гаплотипы, где каждый представлен единственной особью, за

исключением двух гаплотипов представленных дважды. От звездообразной структуры явно дистанцировалась группа, образовавшая некий хвост.

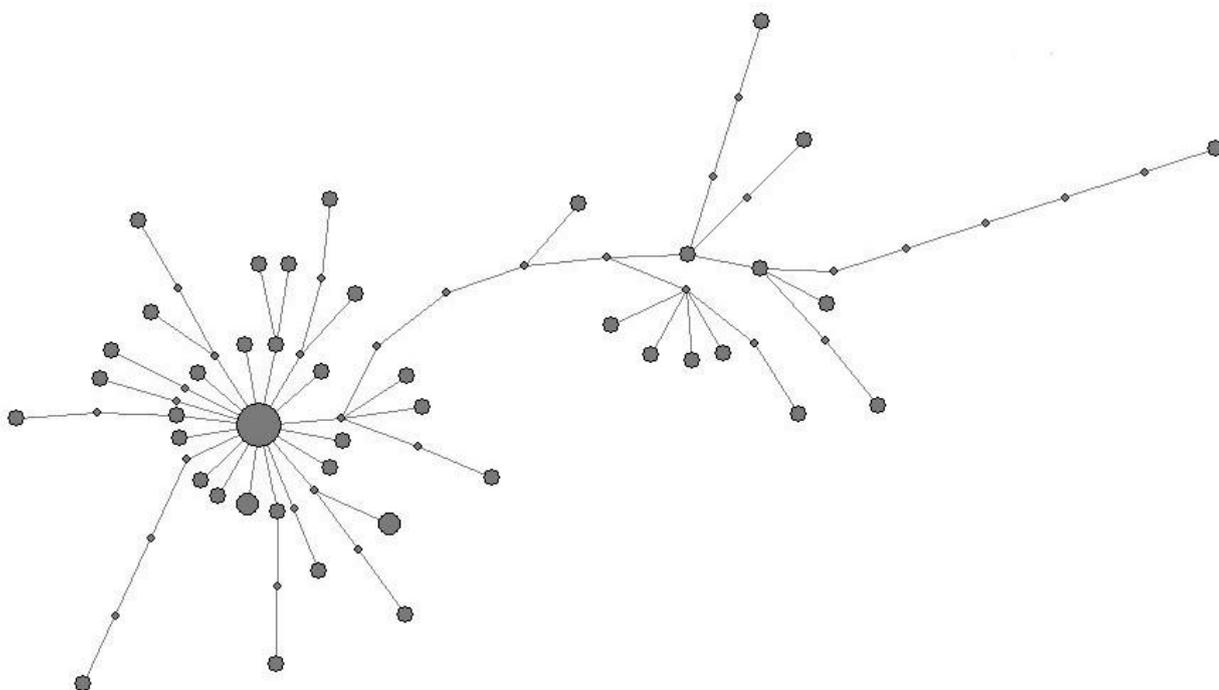


Рисунок 11. Сеть гаплотипов построенная в программе Network для последовательностей фрагмента COI рачка *E. chankensis*.

Анализ распределения попарных различий между гаплотипами мтДНК построенный в программе DNAsp выявил в анализируемой выборке два пика в области трех (самый большой) и 8 попарных различий (Рис. 12). Если исключить из анализа попарных различий группу гаплотипов, составляющую в сети гаплотипов «хвост», то график (Рис. 13) принимает вид унимодальной кривой, где большинство попарных различий находится в области малых генетических расстояний. График попарных различий для хвостовой группы не столь однороден (Рис. 14). Здесь наблюдаются небольшие дополнительные пики.

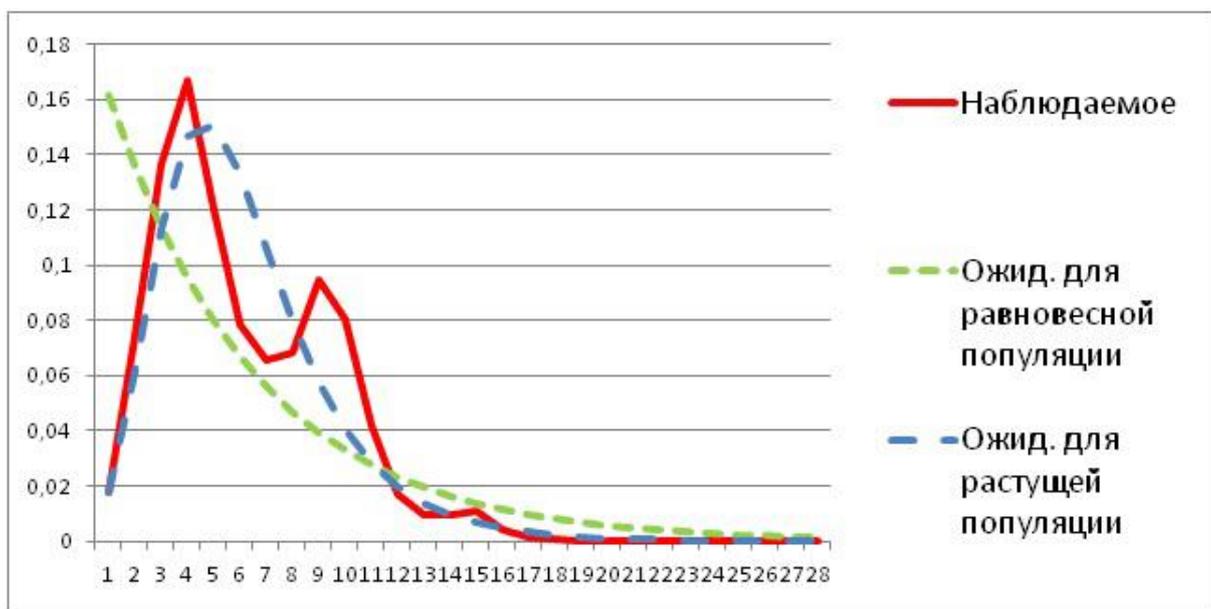


Рисунок. 12. График распределения частот значений попарных различий мтДНК *E. chankensis* всех гаплотипов.

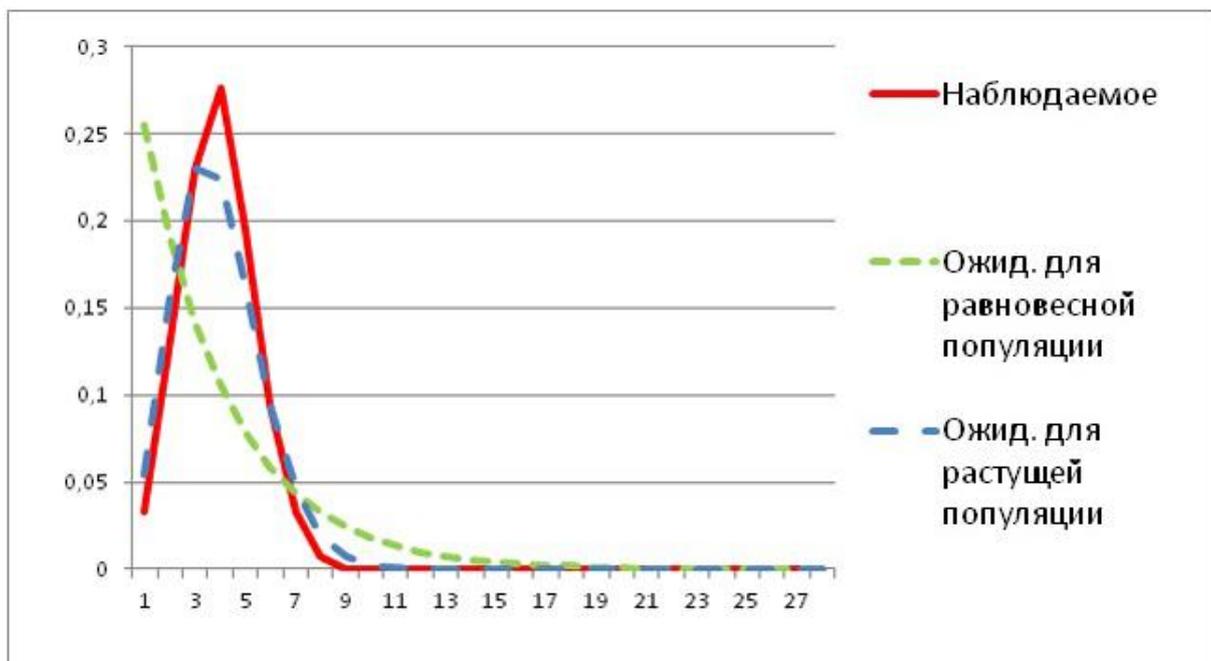


Рисунок. 13. График распределения частот значений попарных различий мтДНК *E. chankensis* центральных гаплотипов.

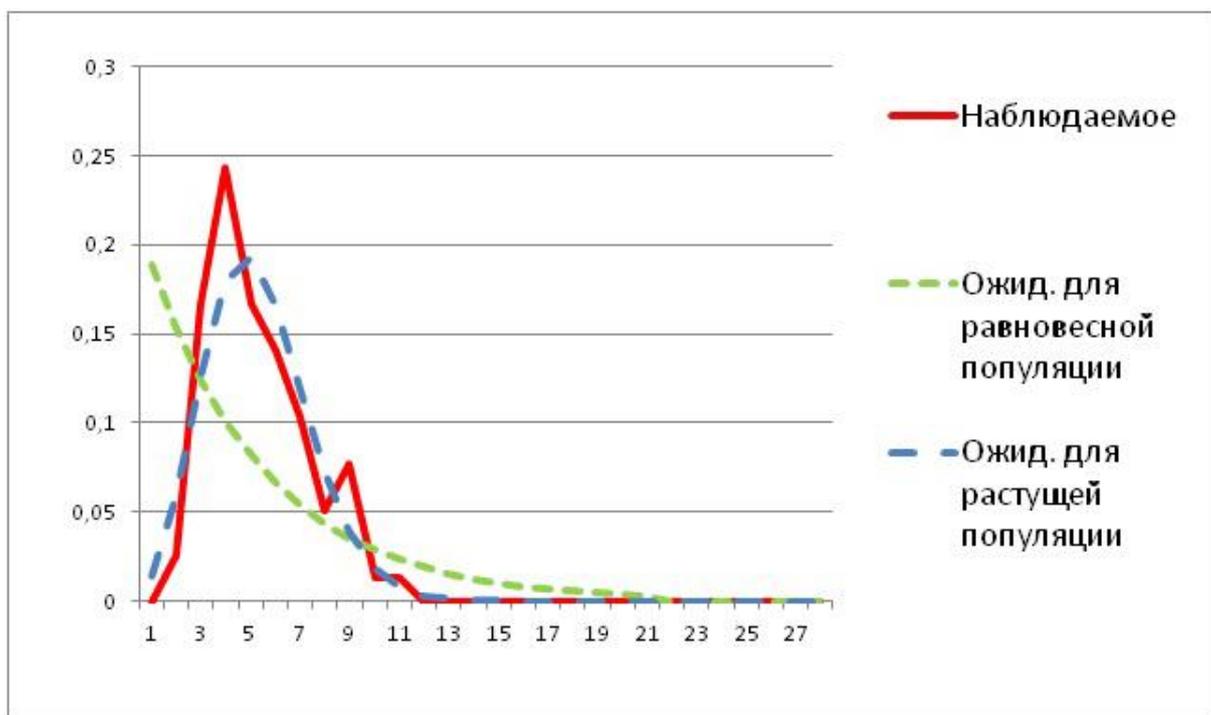


Рисунок. 14. График распределения частот значений попарных различий мтДНК *E. chankensis* хвостовой группы

Гаплотипы *E. chankensis*, таким образом, разделились на две группы, «центральную» обозначенную в дальнейшем «*E. chankensis* группа 1» и «хвостовую» обозначенную в дальнейших тестах как «*E. chankensis* группа 2».

Тест нейтральности Tajima D показал, что «*E. chankensis* группа 1» имела достоверно отрицательные ($P < 0.05$) значения D статистики (Таблица 1), что свидетельствует об экспансии (резком возрастании численности), либо воздействии движущего отбора. Тест R2 (Таблица 1), для этой группы, дал достоверное отклонение от нейтральности ($P < 0.05$) в пользу гипотезы популяционной экспансии. Для «*E. chankensis* группа 2» популяционное тестирование не дало достоверного отклонения от гипотезы нейтральности при формировании популяционного разнообразия. Наибольшие относительные отличия между средним числом попарных различий θ_π и долей полиморфных сайтов θ_s наблюдается для популяции «*E. chankensis* группа 1.».

Реконструкция истории изменяя эффективной численности популяций (Рис.15) показала, что в течении всего периода существования наибольший рост

наблюдался в «*E. chankensis* группа 1.». Для популяции «*E. chankensis* группа 2» также наблюдался рост эффективной численности, но в гораздо меньшем масштабе (учитывая логарифмическую шкалу на графиках). Обе популяции *E. chankensis* увеличивали свой размер с максимальной скоростью в период от 0,4 до 0,25 млн. лет назад [Zaidykov et al., 2020]. При приближении к настоящему моменту времени эффективная численность всех исследуемых популяций стабилизировалась.

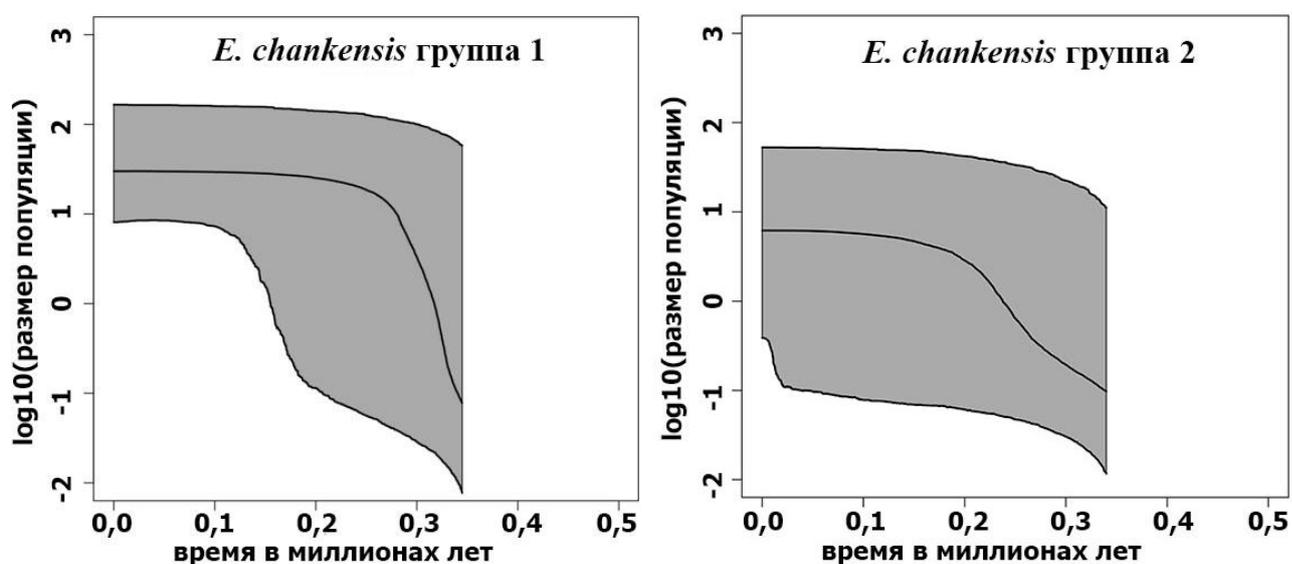


Рисунок 15. Результаты реконструкция истории изменения эффективной численности двух групп гаплотипов *E. chankensis* (*E. chankensis* группа 1 и *E. chankensis* группа 2) с помощью Бейсовского скайплота. Серая область на графиках показывает 95% доверительный интервал для оцениваемой эффективной численности популяции. Промежуточная кривая - медианное значение для эффективного размера популяции.

E. nordenskioldi. Общий размер анализируемого фрагмента COI, для *E. nordenskioldi* составил 709 п.н. (добавлен в Gen BankGenBank под номером MT131782). Было отсеквенировано 8 последовательностей, все они оказались идентичны, вероятно, это связано с тем, что пробы отбирались из небольшого паркового озера. В связи с этим, оценка популяционных параметров для *E.*

nordenskioldi не проводилась и данный вид использовался главным образом как внешняя группа.

Общее филогенетическое древо. На основе уникальных гаплотипов фрагмента COI *E. baikalensis* и *E. chankensis* построено филогенетическое древо (Рис. 16) с молекулярными датировками [Zaidykov et al., 2020]. Анализ, определяющий уровень насыщения, выполненный в программе Dambе v.6.4 [Xia, Lemey, 2009], для данного набора гаплотипов показал пригодность данных для филогенетических датировок (Таблица 3).

Таблица 3. Результаты теста на насыщение нуклеотидных замен для последовательностей COI *E. baikalensis* и *E. chankensis*. “Iss” – показатель насыщения замен; “Iss.c” – критическое значение Iss; “Iss.cSym” – “Iss.c” для симметричной топологии; “Iss.cAsym” – “Iss.c” для ассиметричной топологии.

NumOTU	Iss	Iss.c Sym	Iss.c Asym
4	0,100	0,799	0,766
8	0,094	0,756	0,645
16	0,092	0,729	0,519
32	0,090	0,707	0,379

Все показатели насыщения замен Iss (index of substitution saturation) были значительно ниже критических значений насыщения Iss.c, при которых на основе последовательностей уже нельзя выстроить правильную топологию. Но, при добавлении гаплотипа *E. nordenskioldi*, данный анализ уже показывал наличие насыщения, что не позволило использовать гаплотип *E. nordenskioldi* для молекулярных датировок по всем трем позициям.

В программе Jmodeltest-2.1.7 [Darriba et al., 2012] установлено, что наиболее оптимальной моделью эволюции ДНК для набора данных является НКУ+I+G (наименьшее значение BIC=6521.48). При филогенетических реконструкциях наиболее оптимальной оказалась модель (Таблица 4) speciation birth-death process with strict molecular clock (наибольшее likelihood value). Филогенетическое древо, построенное с помощью этой модели, использовалось для дальнейшего анализа и выводов.

Таблица 4. Сравнение эволюционных моделей для гаплотипов мтДНК COI *E. baikalensis* и *E. chankensis*

Эволюционная модель	Показатель правдоподобия (Likelihood value)	Время расхождения <i>E. baikalensis</i> и <i>E. chankensis</i> в миллионах лет назад (95% ДИ)
Speciation yule process + Strict clock	-2335,32	6,04 (4,34 – 7,94)
Speciation yule process + Uncorrelated relaxed clock	-2335,64	6,01 (4,27 – 7,96)
Speciation birth-death process + Strict clock	-2321,13	13,71 (8,34 – 21,43)
Speciation birth-death process + Uncorrelated relaxed clock	-2321,57	15,19 (8,31 – 23,25)

На построенном филогенетическом древе (Рис. 16) время до общего предка для *E. baikalensis* и *E. chankensis* составило 13,71 млн. лет (95% доверительный интервал (ДИ): 8,34 - 21,42 млн. лет). Уникальные гаплотипы *E. baikalensis* образуют на филогенетическом древе единый кластер без внутренней подразделенности, со временем разделения от общего предка 0,58 млн. лет и 95% доверительным интервалом 0,37 – 0,89 млн. лет. Уникальные гаплотипы *E. chankensis* разделились на два кластера полностью соответствующие выделенным

ранее группам гаплотипов («*E. chankensis* группа 1» и «*E. chankensis* группа 2»). Разделение выявленных групп гаплотипов *E. chankensis* произошло 0,69 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,39 – 1,06 млн. лет. Разделение гаплотипов внутри кластера «*E. chankensis* группа 1» произошло 0,41 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,25 – 0,64 млн. лет. Разделение гаплотипов внутри кластера «*E. chankensis* группа 2» произошло 0,44 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,22 – 0,69 млн. лет.

В программе Network с использованием алгоритма Median Joining (MJ) были построены сети гаплотипов по COI для представленных трех видов рода *Epischura*. Т.к. анализ насыщения замен, при добавлении гаплотипов *E. nordenskioldi*, показал наличие насыщения, то медианную сеть гаплотипов построили только с учетом двух первых позиций кодона (Рис. 17). На полученной медианной сети, группа гаплотипов *E. chankensis* занимает промежуточное положение между гаплотипами *E. nordenskioldi* и *E. baikalensis*.

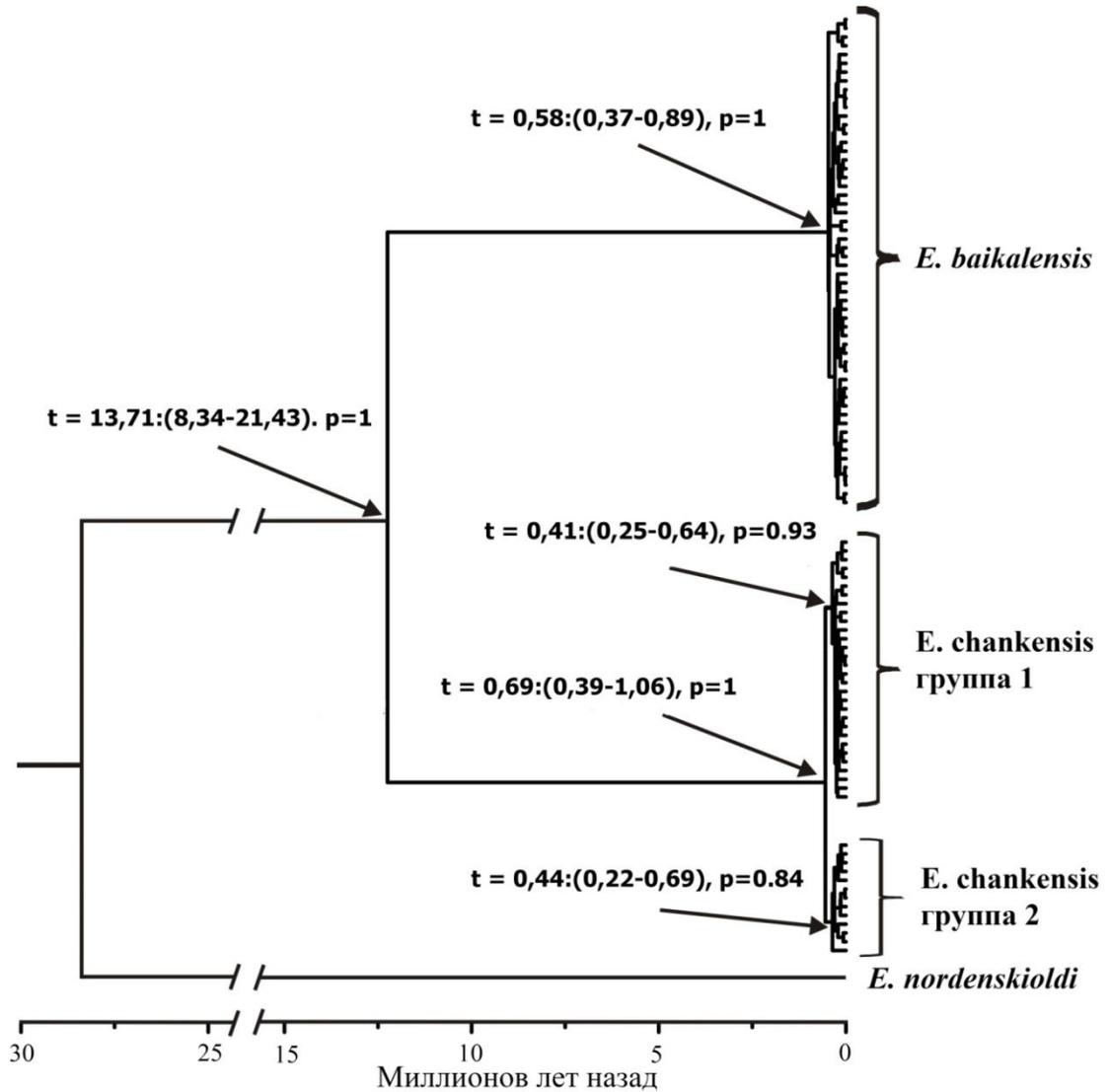


Рисунок 16. Дерево с временной шкалой, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена COI мтДНК в программе BEAST. Приведены датировки дивергенции таксонов в основных узлах, в скобках указаны 95% доверительные интервалы для датировок. Для этих же узлов приводится статистическая поддержка p - апостериорная вероятность.

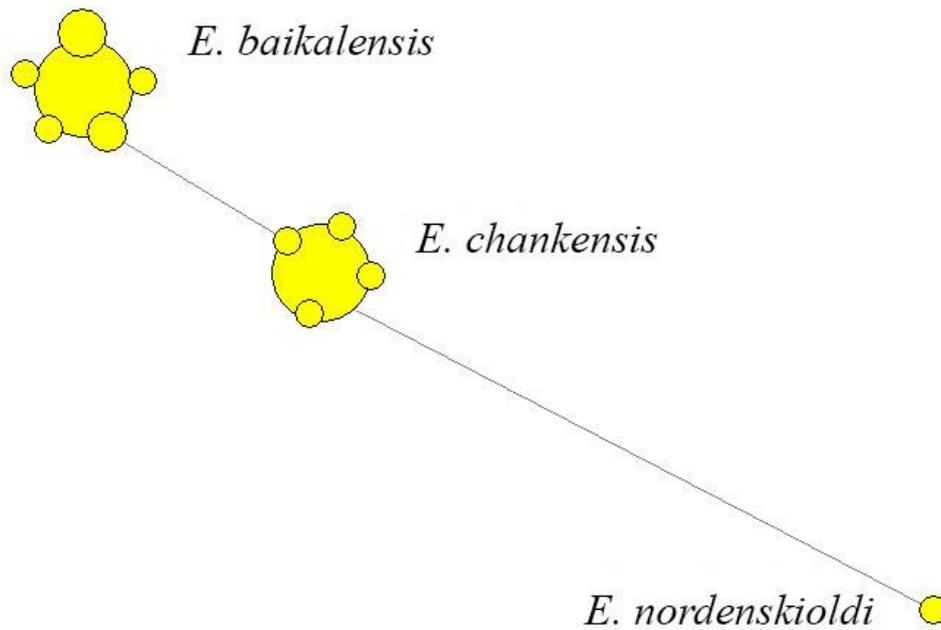


Рисунок 17. Медианная сеть гаплотипов, построенная в программе Network с помощью алгоритма Median Joining, на основе последовательностей COI от трех видов *Epischura* с учетом только 1-й и 2-й позиций кодона.

3.1.2. Фрагмент ядДНК ITS1

E. baikalensis. Выполнен анализ нуклеотидной последовательности рибосомного спейсера ITS1 ядДНК, который имел целью провести дополнительную проверку наличия/отсутствия подразделенности *E. baikalensis* в озере Байкал. Общая длина анализируемого фрагмента составила 303 п.н. Проанализированы последовательности от 9 особей, по три особи с каждой котловины. Все последовательности оказались абсолютно идентичны. Последовательность добавлена в GenBank под номером MF134402.

E. chankensis. Проведен анализ нуклеотидной последовательности рибосомного спейсера ITS1. Общая длина анализируемого фрагмента составила 306 п.н. Чтобы протестировать наличие репродуктивной обособленности по ядерному геному были выборочно определены нуклеотидные последовательности ITS1: Три последовательности, от особей, чьи гаплотипы мтДНК COI относились к группе «*E. chankensis* группа 1» (центральная) и два образца из группы «*E.*

chankensis группа 2» (образовавшей хвост), наиболее дистальных по отношению к «*E. chankensis* группа 1» (один из них имел по COI не синонимичную замену). Анализ ITS1 показал, что во всех пяти образцах присутствовала общая для всех аллель. В двух образцах эта аллель была гомозиготной, а в трех остальных обнаружена гетерозиготность. В каждом случае вторая аллель отличалась на одну замену. Альтернативные аллели имели мутации в разных участках. Гетерозиготность встретилась в одном из образцов, относившихся по маркеру COI к «*E. chankensis* группа 1» и у двух относившихся к «*E. chankensis* группа 2». Уникальные последовательности добавлены в GenBank под номерами MF134403–MF134405.

E. nordenskioldi. Для *E. nordenskioldi* отсеквенирована одна последовательность фрагмента ITS1 длиной 312 п.н., которая и использовалась как внешняя группа. Добавлена в GenBank под номером MF134406.

Общее филогенетическое древо. На основе уникальных последовательностей ITS1 (длина фрагмента 315 п.н.) трех выше обозначенных видов в программе BEAST построили филогенетическое древо (Рис. 18), в качестве модели эволюции использовали модель JC69 [Jukes, Cantor, 1969], подобранную в качестве оптимальной программой Jmodeltest-2.1.7 [Darriba et al., 2012]. Общая топология дерева соответствует построенному на основе COI.

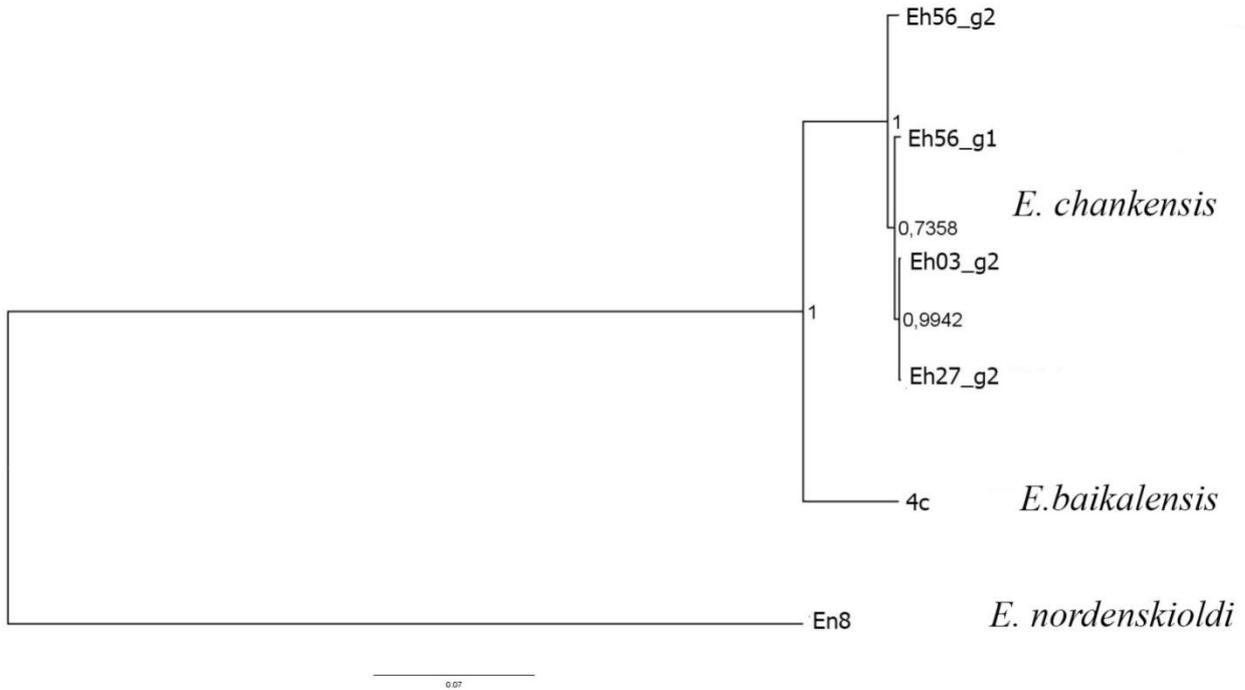


Рисунок 18. Филогенетическое древо, построенное на основе нуклеотидных последовательностей рибосомного спейсера ITS1 трех видов рода *Epischura* в программе BEAST.

3.1.3. Нуклеотидная последовательность рибосомного гена 18S.

Последовательности 18S у *E. baikalensis* и *E. chankensis*, несмотря на то, что время предположительного расхождения этих видов довольно большое – не отличались. От последовательности *E. nordenskioldi* общая последовательность *E. baikalensis*/*E. chankensis* отличались на 2,7 %.

3.2. Морфологический анализ

3.2.1. Структуры интегумента *E. baikalensis*.

Проведен анализ расположения микроструктур цефалона (Таблицы Приложения I и II) двух выборок представителей *E. baikalensis* с Северного и Южного Байкала [Наумова, Зайдыков, 2016]. Наблюдается большой разброс в числе ультраструктур интегумента от 0 до 5 или от 2 до 8 по некоторым секторам, разброс же значений по общему числу структур варьирует от 2 до 26 для Юга и от 6 до 23 для Севера. Хотя максимальные значения общего количества структур (26

и 23 соответственно) определяются статистическими тестами как выбросы, однозначно определить их характер сложно, нельзя с определенностью сказать являются они результатом ошибки измерения или же выпадают вследствие недостаточного размера выборки. Но даже при исключении определяющихся как выбросы значения, разброс числа структур для цефалона в целом остается весьма высоким от 2 до 16 для южной выборки и от 6 до 20 для северной. Доля асимметричных особей составила 86% у северной и 70% у южной выборок. Доля особей асимметричных по 1 признаку от общего числа асимметричных особей для северной выборки составляла 40%, а для южной 26,3% (Таблица 5). В южной выборке доля особей асимметричных по двум признакам выше, чем в северной (57,9 и 28% соответственно). Нарушение симметрии по трем признакам максимальна у северной выборки (28%), а у южной почти в два раза меньше (10,5%). По четырем признакам у северной выборки асимметричность 4%, у южной 5,3%.

Таблица 5. Доля асимметричных (А) и симметричных (С) особей *E. baikalensis* в Северной и Южной частях озера Байкал, 2009 г

Место отбора проб	Кол-во, экз.	А, %	С, %	Доля особей, асимметричных по разному числу признаков, %			
				1	2	3	4
Северная часть Байкала	29	86,2	13,8	40	28	28	4
Южная часть Байкала	27	70,4	29,6	26,3	57,9	10,5	5,3

Доля асимметрии для выборок отличается в основном на боковых участках (Рисунок 19). Наличие пор и шипиков наблюдалось только в торакальном и соединительном сегментах цефалона. Доля особей с проявлением асимметрии на этих частях цефалона была у южной выборки: 40,7% для боковых и 18,5% для

средних секторов на торакальной части, а для соединительной 25,9 и 48,1% соответственно. У особой северной выборки основное проявление асимметрии признаков приходится на соединительный сектор цефалона (примыкающий к абдомену), доля особей, асимметричных по числу структур на этой части составляла 69 и 51,7% для боковых и средних секторов, в то время как на торакальной части 26,6 и 17,2%.



Рисунок 19. Асимметрия между секторами цефалона *E. baikalensis* у особей из разных районов Байкала. Буквами обозначены районы цефалона, по вертикали: Р – рострум, А – антенальный, М – мандибулярный, Т – торакальный, С – соединительный; по горизонтали: ЛБ – левый боковой, ЛС – левый средний, Ц – центральный, ПС – правый средний, ПБ – правый боковой.

Чтобы определить какими статистическими методами (параметрическими или не параметрическими) пользоваться для анализа данных, с помощью критерия Шапиро-Уилка проверили нормальность распределения числа структур на цефалоне (ПРИЛОЖЕНИЕ III) и показателей асимметрии (ПРИЛОЖЕНИЕ IV).

Согласно данным статистического анализа гипотеза о нормальном законе распределения ($P > 0,05$) подтвердилась только для общего числа структур у северной выборки и показателей общей асимметрии для выборок с севера и юга. Таким образом, использование параметрических статистических методов

возможно только для сравнения показателей общей асимметрии выборок, для всех остальных оправдано использование непараметрических методов.

Нарушение симметричного расположения признаков может быть генетически обусловлено и носить адаптивный характер. Проявляется такое нарушение в виде смещенной асимметрии и антисимметрии [Зорина, 2012], когда на одной стороне количество структур может быть стабильно выше, чем на другой.

Для исключения направленной асимметрии [Гелашвили, 2004] провели статистическое сравнение распределения показателей между левой правой сторонами (ПРИЛОЖЕНИЕ V). Так как сравниваемые распределения отличаются от нормального, использовали непараметрический критерий Уилкоксона – Манна – Уитни.

Во всех случаях (ПРИЛОЖЕНИЕ V) статистически значимые отличия между сравниваемыми участками цефалона слева и справа отсутствовали ($P > 0,05$), что является признаком ФА и исключает направленный характер асимметрии [Гелашвили, 2004]. Далее провели тесты на идеальную ФА [Гелашвили, 2004], позволяющие отличить ее от антисимметрии. Для этого мы определили отклонения эксцесса (ПРИЛОЖЕНИЕ VI), сравнивая их с табличными критическими значениями при $\alpha = 0,05$ [Лакин, 1990].

Выявлены отклонения эксцесса превышающие критические значения, но все они имеют положительные значения. О антисимметрии свидетельствуют отрицательные значения эксцесса, в то время как положительные могут говорить о гетерогенности популяции [Rowe, 1997; Van Dongen, 1998; Гелашвили, 2004; Зорина, 2012]. О морфологической неоднородности популяции свидетельствует и высокий разброс количества структур интегумента. Соответственно мы имеем дело с флуктуирующей асимметрией (ФА) в гетерогенной популяции.

Проведено сравнение выборок (ПРИЛОЖЕНИЕ VII) с юга и севера по показателям ФА (ПРИЛОЖЕНИЕ I и II): общая асимметрия и средняя частота асимметричного проявления на признак. Также выборки с юга и севера сравнили

между собой в количестве структур отдельно по участкам цефалона и по общему числу структур на всем цефалоне.

Выборки не имели значимых отличий ($P > 0,05$) ни по одному из сравниваемых параметров, что можно интерпретировать как отсутствие значимых отличий между северной и южной популяциями эпишуры как по уровню ФА, так и по количеству структур в целом.

3.2.2. Морфологические исследования ротовых конечностей

При проведении СЭМ исследования [Зайдыков, Наумова, 2011; Наумова, Зайдыков, 2020] мы обнаружили, что вторые антенны (An_2) и пальпы мандибулы *E. chankensis* и *E. baikalensis* несут по несколько длинных гладких сет (щетинок). Первая и вторая максиллы (Mx_1 и Mx_2) и максиллипеды (Mp) обоих видов имеют сету, покрытые небольшими сетулами. Результаты измерения конечностей приведены в таблице (Приложение VIII). У обоих видов сетулы на Mx_1 создают плотную сеть (Рис. 20). Средняя длина ячейки, образованной сетами и сетулами Mx_1 , составляет около 1 мкм для *E. baikalensis* и 0,3 мкм для *E. chankensis*. Размер ячейки сети, образованной сетами и сетулами на Mx_2 , составлял 3,2 мкм для *E. chankensis* и 9,1 мкм для *E. baikalensis*. При этом диаметр (толщина) самих сетул у этих двух видов не различается.

Длина сет на всех оральных придатках *E. baikalensis* была больше, чем *E. chankensis*, в некоторых случаях более чем в два раза. Также, значительно различалась длина конечностей. Отношение длины тела к длине Mx_1 составило у *E. chankensis* 12,3, а у *E. baikalensis* 8,2. Отношение длины тела к длине Mx_2 у этих видов отличалось не так сильно и у *E. chankensis* составляло 8,6, а у *E. baikalensis* 7,2. Отношение длины тела к длине сет Mx_2 составляло 10,8 у *E. chankensis* и 6,9 у *E. baikalensis*. Таким образом, *E. baikalensis* имеет ротовые конечности значительно длиннее, чем *E. chankensis*. Поэтому и площадь, покрываемая Mx_2 у *E. chankensis*, почти в два раза меньше, чем у *E. baikalensis*. Площадь, которую охватывают Mx_1 , у этих видов различалась почти в пять раз (Приложение VIII).

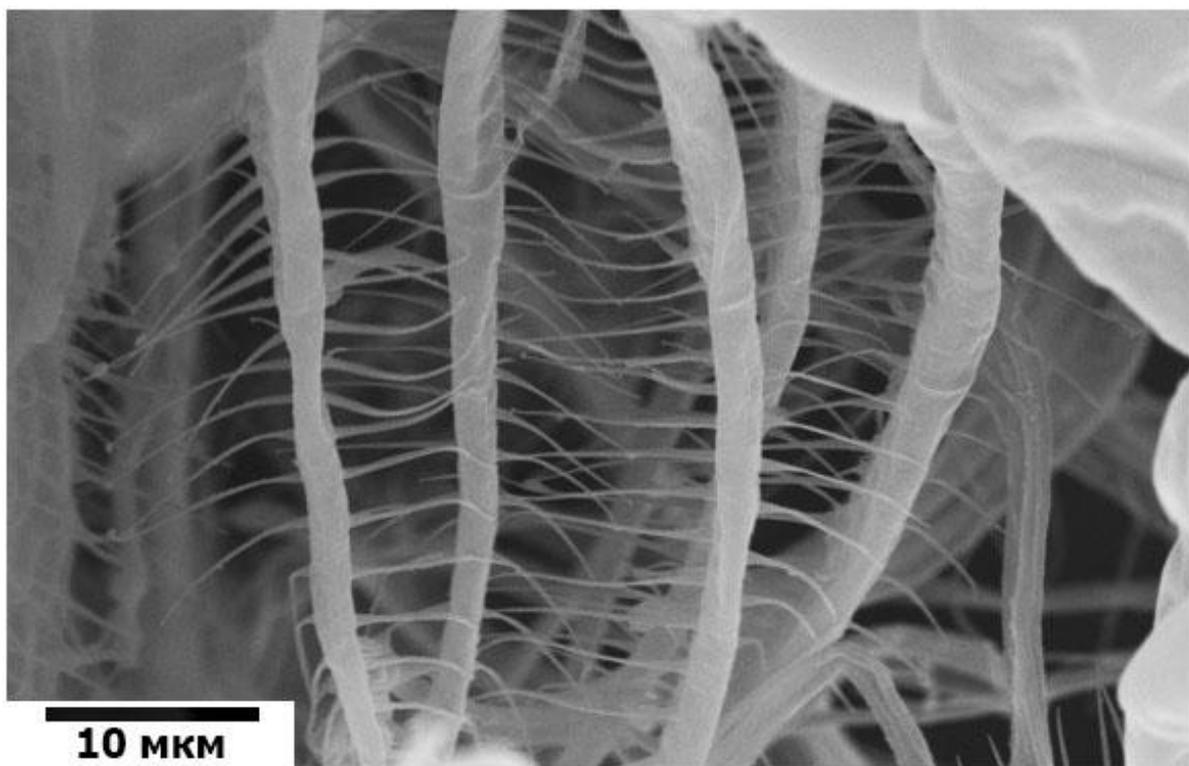


Рисунок 20. Сеть, создаваемая сетами и сетулами первых Максилл (Mx1). Фото СЭМ.

Строение мандибул. Исследование мандибулярных пластинок с помощью световой и электронной микроскопии выявило ряд особенностей [Naumova et al., 2015].

E. baikalensis (Рис.21 А, С). Вентральный зубец V_1 (см. Рис.22) имеет широкое основание и острую вершину с бороздчатой поверхностью. Граница между коронкой и телом мандибулы плохо различима. Центральные зубцы ($C_1 - C_3$) имеют три острые вершины. Более высокие зубцы расположены по краям. D_1 и D_2 острые, двувершинные. D_3 одновершинный, почти вдвое длиннее D_1 . Дорсальная щетинка гладкая, укороченная. Поверхность мандибулярной пластинки с вентральной стороны покрыта мелкими шипиками. Все мандибулярные зубцы расположены близко друг к другу. Правая и левая мандибулы симметричны. Встречались экземпляры со сточенными центральными зубцами и обломанной коронкой вентрального зубца мандибулы.

E. chankensis (Рис 21 В, D). Два вентральных зубца, (V_1 , V_2) оканчиваются округлыми вершинами. Эти зубцы имеют неровную бугристую поверхность. Выраженной коронки не заметно. Центральные зубцы (C_1 – C_3) гладкие одновершинные, без придатков и щетинок. Дорсальные зубцы (D_1 – D_3) схожи с центральными зубцами по строению. Третий дорсальный зубец меньше остальных в два раза. Дорсальная щетинка гладкая, укороченная. Поверхность мандибулярной пластинки гладкая, без шипиков. Все исследованные экземпляры имели острые центральные и дорсальные зубцы.

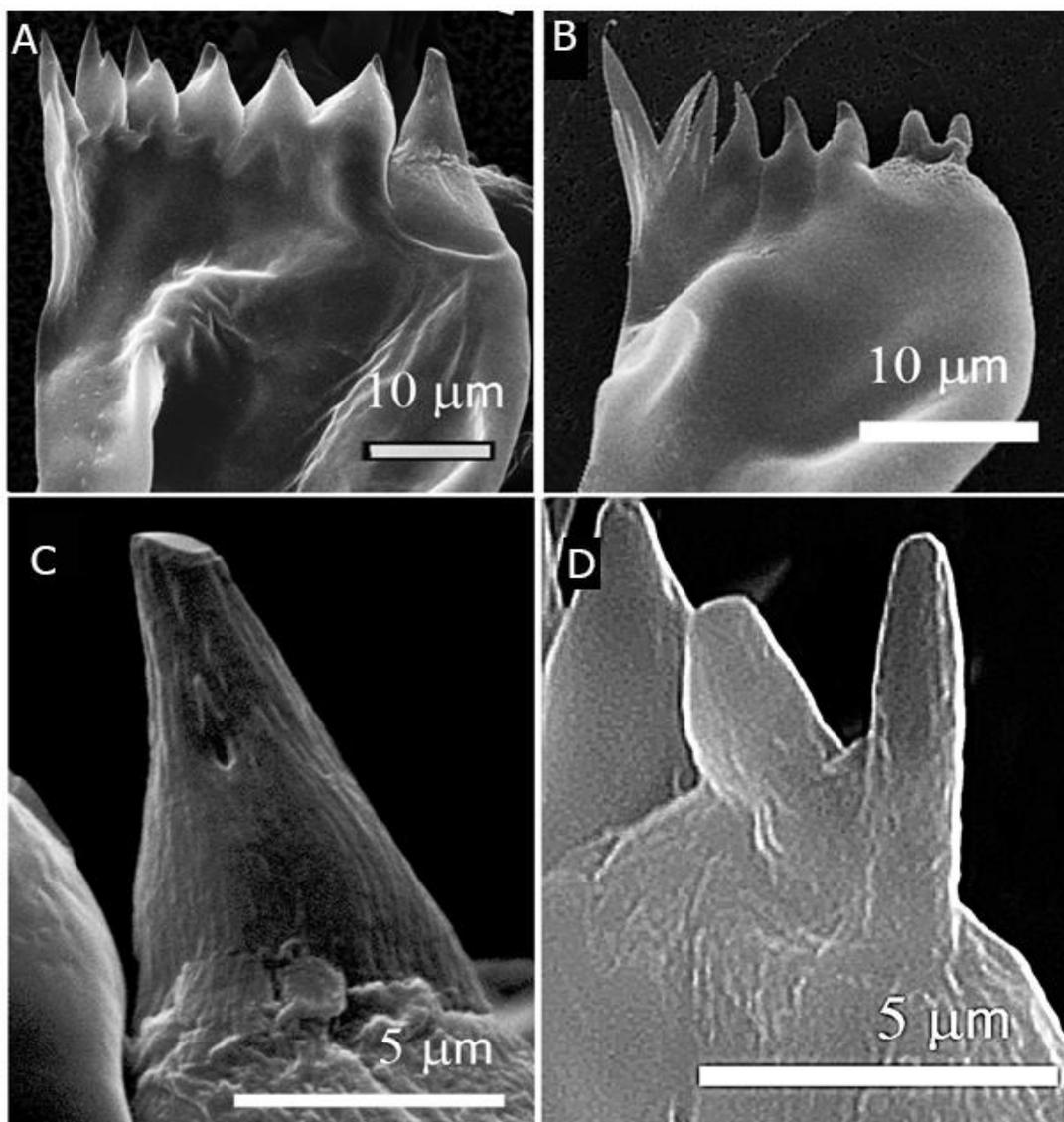


Рисунок 21. Мандибулярные пластинки и первые вентральные зубцы V_1 двух видов рода *Episichura*: (A, C) *E. baikalensis*, правая мандибула; (B, D) *E. chankensis*, правая мандибула.

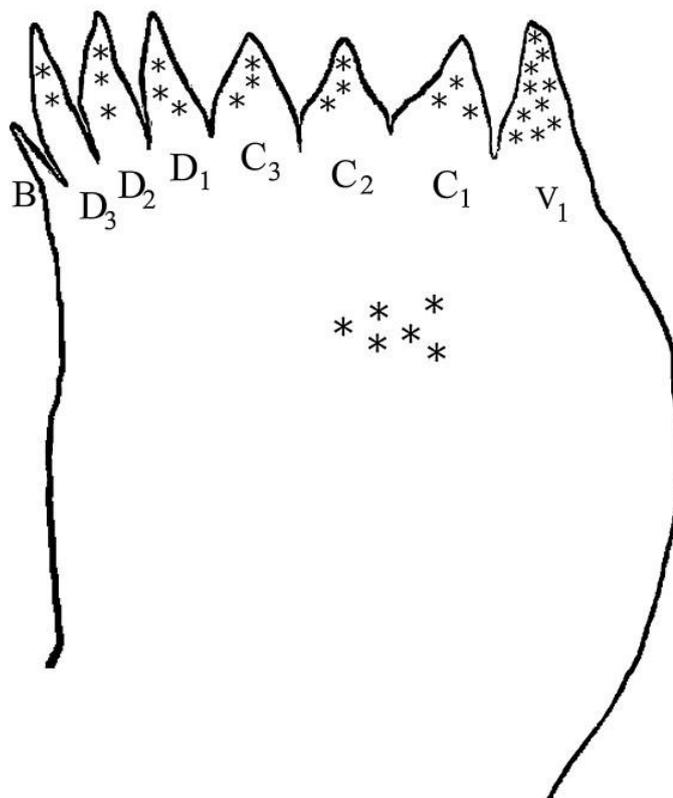


Рисунок 22. Схема мандибулярной пластинки. Обозначения: C₁–C₃ центральные зубы; D₁–D₃ дорсальные зубы; V₁ вентральный зуб; B, дорсальная щетинка. Звездочками (*) отмечены области, в которых проводился EDAX анализ.

EDAX-зондирование (метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии) показало, что в элементном составе коронок вентральных зубцов у *E. baikalensis* и *E. chankensis* среднее содержание кремния (Таблица 6) в 10-15 раз больше, чем в основании мандибулярной пластинки. Содержание кремния в обоих вентральных зубцах (V₁ и V₂) у *E. chankensis* примерно одинаковое. Максимальное относительное содержание кремния от общего содержания других элементов в коронках у видов отмечены следующие: *E. baikalensis* - 39 %, *E. chankensis* – 11 %.

Таблица 6. Среднее содержание кремния в мандибулах по данным EDAX и трофический статус видов *Epischura*.

Вид	Содержание кремния, %		Тип питания*	Источник
	V ₁	Мандибулярная пластинка	Состав пищевого комка	
<i>E. baikalensis</i>	28±6,6 n=50	1±0,8 n=50	Травоядный	Кожова 1953, 1956; Наумова 2006
			Мелкие водоросли (цианопхита, chlorophyta), обломки колониальных диатомовых	
<i>E. chankensis</i>	9±2,0 n=40	1±0,6 n=20	Травоядный, Детритофаг	Наумова, Барабанщиков 2008
			Детрит, диатомеи	

*Трофический статус определен по микроскопическому анализу состава пищевого комка, питанию в эксперименте и по данным из литературных источников.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные молекулярно-генетические исследования позволили выявить уровень гаплотипического разнообразия и популяционную структуру [Зайдыков и др., 2015; 2018], а также реконструировать и датировать историю изменения эффективной численности для популяций *E. baikalensis* в озере Байкал и *E. chankensis* в озере Ханка, определить приблизительное время расхождения видов [Zaidykov et al., 2020]. Морфологические исследования количества структур интегумента [Наумова, Зайдыков, 2018] позволили оценить уровень полиморфизма и флуктуирующей асимметрии по данному признаку. Анализ ротовых конечностей позволил определить особенности строения данных структур [Зайдыков, Наумова, 2011; Naumova et al., 2015; Наумова, Зайдыков, 2020]. Полученные результаты сопоставлены с условиями обитания видов.

4.1 Молекулярно-генетический анализ

По фрагменту мтДНК COI для *E. baikalensis*, так же, как и для *E. chankensis* наблюдался высокий уровень гаплотипического разнообразия (0,998 и 0,982) при низком нуклеотидном разнообразии (0,0095 и 0,0094). Высокий уровень гаплотипического разнообразия указывает на присущий обоим популяциям, текущий большой размер эффективной численности популяции и низкий генетический дрейф. Низкое нуклеотидное разнообразие может указывать на то, что в относительно недавнем геологическом прошлом, популяции обоих видов прошли период резкого увеличения численности из предковой популяции с низким эффективным размером. За относительно короткий период времени в популяции появилось большое количество гаплотипов с небольшими генетическими расстояниями.

Распределения попарных различий между гаплотипами на соответствующих графиках, построенных в программе DNAsp v.5 (Рис.7, 12, 13, 14) подтверждают наличие резкого увеличения численности в прошлом. Унимодальное распределение (имеющее один пик), наблюдаемое для популяции

E. baikalensis, характерно для популяций прошедших через период резкого увеличения численности, имевший место в относительно недавнем прошлом [Slatkin, Hudson, 1991]. Популяция *E. chankensis* разделилась на две группы (Рис. 11): «центральную» («*E. chankensis* группа 1») и «хвостовую» («*E. chankensis* группа 2»). Первая группа соответствует на графике попарных различий (Рис.13) распределению свойственному для популяций прошедших период резкого увеличения численности. Вторая группа (Рис. 14) имеет близкое к растущей популяции распределение, но с некоторыми отклонениями, которые могут быть обусловлены не полной однородностью данной группы.

На филогенетическом древе (Рис. 16), построенном на основе фрагмента мтДНК COI, время до общего предка для *E. baikalensis* и *E. chankensis* составило 13,71 млн. лет (95% доверительный интервал (ДИ): 8,34 - 21,42 млн. лет). Данные датировки совпадают с датировками для данного исторического момента имеющимися в литературе, которые были получены по ядерным генам ($14,81 \pm 0,88$ млн. лет) [Bowman, 2019], что говорит об уместности их применения для других филогенетических и популяционно-генетических событий. Обозначенные датировки говорят о продолжительном существовании представителей рода *Epischura* на территории Азии. Миграция животных между Северной Америкой и Евразией могла идти через Берингию, соединявшую два данных континента в единый суперконтинент [Гладенков, Гладенков, 2004]. Эта связь между континентами существовала более 100 млн. лет, начиная с раннего мела до позднего миоцена (около 5 млн. лет назад), когда начал формироваться Берингов пролив [Marincovich et al., 1990].

На филогенетическом древе уникальные гаплотипы *E. baikalensis* образуют единый кластер, без внутренней подразделенности, со временем коалесценции 0,58 млн. лет с 95% ДИ 0,37 – 0,89 млн. лет. Это согласуется с данными распределения гаплотипов в сетях Network (Рис. 9-10), а также распределением на графике попарных различий (Рис. 8). Сети гаплотипов и унимодальный характер распределения на графике попарных различий говорят об отсутствии

популяционной подразделенности *E. baikalensis* в оз. Бакал. Здесь этот вид представлен одной полиморфной популяцией.

Уникальные гаплотипы *E. chankensis* разделились на два кластера соответствующие группам («*E. chankensis* группа 1» и «*E. chankensis* группа 2»). Таким образом, обнаруженная на сети гаплотипов (Рис.11) подразделенность – подтвердилась и на филогенетическом дереве. Разделение групп произошло 0,69 млн. лет назад с 95% ДИ 0,39 – 1,06 млн. лет. Разделение гаплотипов внутри кластера «*E. chankensis* группа 1» произошло 0,41 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,25 – 0,64 млн. лет. Разделение гаплотипов внутри кластера «*E. chankensis* группа 2» произошло 0,44 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,22 – 0,69 млн. лет. Популяции обоих видов имеют сходные датировки начала своего существования, что может говорить об общности процессов, повлиявших на их расселение или выживание, а также формирование популяционно-генетической структуры. Значительное влияние на формирование популяционно-генетической структуры могли оказать глобальные изменения климата и геологические перестройки, которые влекли за собой изменение привычных условий существования видов, изменение прежних мест обитания или образование новых.

Реконструкция истории изменения эффективной численности популяций (Рис. 8, 15) показала, что в течении всего периода существования наибольший рост наблюдался у популяции *E. baikalensis* и «*E. chankensis* группа 1» у вида *E. chankensis*. Для «*E. chankensis* группа 2» вида *E. chankensis* также наблюдался рост эффективной численности, но в гораздо меньшем масштабе (учитывая логарифмическую шкалу на графиках). В отличие от популяции *E. baikalensis*, максимальна скорость роста эффективной численности которой наблюдалась в период с 0,18 до 0,1 млн. лет, обе популяции *E. chankensis* увеличивали свой размер с максимальной скоростью в период от 0,4 до 0,25 млн. лет назад. При приближении к настоящему моменту времени эффективная численность всех исследуемых популяций стабилизировалась.

Результаты популяционно-генетических анализов показывают (Таблица 1), что наибольшие значениями параметра θ_π наблюдаются для популяции *E. baikalensis* и «*E. chankensis* группа 2». «*E. chankensis* группа 1» обладала меньшим значением этого параметра. Максимальные значения θ_s были у популяций *E. baikalensis* и «*E. chankensis* группа 1». Во всех популяциях θ_π по значению было меньше чем θ_s . Большая разница между значениями θ_π и θ_s указывает на ненейтральный характер эволюционного процесса в популяции [Tajima, 1996], а именно, резкие изменения в размере популяции или эффект естественного отбора. Для митохондриальных геномов параметр $\theta=2Ne\lambda$ (Ne – число самок, участвующих в размножении, λ – вероятность мутации). Так как λ в исследовании была постоянной величиной (при филогении поддерживалась гипотеза строгих часов), то изменения θ и наращение нейтральности на популяционном уровне могло происходить только за счет резких изменений Ne . Параметр Ne пропорционален эффективному размеру популяций, поэтому смещения в значениях θ_π и θ_s происходило за счет изменения эффективного размера популяций. Это подтверждается популяционными тестами для *E. baikalensis* и «*E. chankensis* группа 1». Для этих популяций значения D статистики были достоверно отрицательными ($P<0,05$) (Таблица 1), что, опять же, свидетельствует об экспансии (резком возрастании численности), либо воздействии движущего отбора. Для этих же популяций (Таблица 1) тест $R2$ дал достоверное отклонение от нейтральности ($P<0,05$) в пользу гипотезы популяционной экспансии. Для «*E. chankensis* группа 2» популяционное тестирование не дало достоверного ($P>0,05$) отклонения от гипотезы нейтральности при формировании популяционного разнообразия. Это может быть связано с тем, что в этой популяции в прошлом, если и происходили увеличения численности, то они были не значительными. Наибольшие относительные различия между θ_π и θ_s наблюдается для «*E. chankensis* группа 1». В этой группе, в прошлом, вероятно, произошел самый большой рост численности. Результаты популяционных тестов совпадают с выводами, получаемыми при Bayesian Skyline Plot анализе и графиками, полученными Mismatch Distribution.

Таким образом, *E. baikalensis* в Байкале представлена высоко полиморфной, панмиксной популяцией, прошедшей 0,18 до 0,1 млн. лет назад через период резкого увеличения численности (бутылочное горлышко). Протяженность, деление на котловины, или большие глубины озера Байкал не создают для *E. baikalensis* значимых географических или экологических барьеров. Разные генерации *E. baikalensis*, отличающиеся размером особей относятся к единой популяции. Важным является и то, что наличие единой популяции *E. baikalensis* подтвердилось использованием маркера ядДНК ITS1, который показал полное единообразие по данному маркеру для особей из разных котловин и генераций.

Ситуация с резким ростом численности неоднозначная, так как оз. Байкал в современных контурах существует порядка 8 млн. лет. Филогенетический анализ (Рис. 14) показывает, что *E. baikalensis* (или его предок) уже мог обитать в озере в течение всего этого промежутка времени, так как исследованные виды к этому времени уже разошлись. Популяционная экспансия *E. baikalensis* происходила при этом от 0,18 до 0,1 млн. лет назад. Резкое увеличение численности может происходить и в том случае, если популяция сначала перенесла падение численности из-за ухудшения условий среды (бутылочное горлышко), а затем эти условия нормализовались, вновь расширив экологическую нишу. Причинами резких уменьшений численности *E. baikalensis* могли быть периодические похолодания климата (ледниковые эпохи). В ледниковые эпохи значительно снижался приток биогенов в озеро Байкал, за счет уменьшения речного стока и как следствие значительно снижалась первичная продукция пелагиали озера. Особенно к снижению концентрации биогенов в воде были чувствительны диатомовые, которым необходимо строить панцирь на основе оксида кремния. В отличие от других байкальских копепод, *E. baikalensis* находила способы выживать в этих условиях, поддерживая небольшую численность популяции благодаря способности питаться различными видами фитопланктона, а также бактериопланктоном и цианобактериями [Афанасьева, 1977] и возможно простейшими [Moore et al., 2019], облавливая большие объемы воды в поисках пищи. У *E. baikalensis* имеется механизм запасания липидов для снижения

зависимости от текущих условий питания и, возможно, поддержания размножения в периоды с низкой первичной продукцией [Bowman et al., 2017]. Наблюдаются вариации в уровне экспрессии генов, связанные с обитанием в разных температурных условиях [Bowman et al., 2018]. Подобные особенности биологии *E. baikalensis* могли сыграть существенную роль в выживании во время глобальных похолоданий. В период потепления и восстановления продуктивности пелагиали озера Байкал *E. baikalensis* увеличивала свою численность по сценарию популяционной экспансии.

Возможен и другой механизм, вызвавший популяционную экспансию *E. baikalensis*. За последние 150 тыс. лет максимальные глубины оз. Байкал увеличились более чем на 600 метров из-за поднятия бортов впадины и опускания дна [Мац и др, 2001]. При этом уменьшилось отношение площади поверхности озера к объему воды в нем. Это послужило причиной уменьшения прогрева воды в летний период и снижению ее среднегодовой температуры. В этих условия *E. baikalensis* как холодолюбивый вид, мог вытеснить другие, более теплолюбивые виды зоопланктона, заняв их экологические ниши.

Группы гаплотипов *E. chankensis* («*E. chankensis* группа 1» и «*E. chankensis* группа 2»), в настоящее время, географически не отделены друг от друга. Использование дополнительного маркера ядДНК ITS1 подтвердило, что сейчас это одна единая популяция. Наличие гетерозигот в рибосомном спейсере можно объяснить незавершенностью процесса согласованной эволюции в мультигенном семействе – внутривидовой гомогенизации, приводящей к образованию гаплоидных нуклеотидных последовательностей (элиминации гетерозиготных аллелей в ядерных локусах) [Liao, 1999]. Можно предположить, что генетическая дифференциация популяций по фрагменту COI сформировалась благодаря географической изоляции в прошлом. Предки двух групп какое-то время существовали изолированно друг от друга, а потом опять соединились в одну группу. Наличие подобной подразделенности можно объяснить значительными изменениями в строении озерно-речной системы в ханкайской котловине и площади озера в ходе сменяющихся периодов ледниковий и межледниковий

плейстоцена, а также различных геологических перестроек [Квасов, 1989; Микишин, 2007; Короткий, 1982, 2007]. Имеющиеся реконструкции истории региона на основе геологических данных [Краснов, 1989; Микишин, 2007; Короткий, 1982, 2007] предполагают, что единый водоем в Ханкайской котловине появился в среднем плейстоцене, а именно в холодное шмаковское время [Короткий, 2007] 0,26 – 0,29 млн. лет [Карта четвертичных образований..., 2013]. До этого, на его территории была сеть речных долин, с небольшими озерами, которые постепенно наполнялись водой и расширялись. В этих изолированных водоемах в прошлом группы особей *E. chankensis* сформировали различные генетические линии с высокой степенью дифференциации. В дальнейшем при синхронном расширении этих озер в Ханкайской котловине и образовался единый водоем с близким современному обликом озера. Как видно из наших датировок (рис. 16), начало существования групп *E. chankensis* относится ко времени до появления единого водоема. После формирования озера *E. chankensis* до настоящего времени сохраняет отпечаток прошлой географической подразделенности.

4.2 Морфологический анализ

4.2.1. Структуры интегумента

На внешних покровах (экзоскелете) ракообразных располагаются поры секреторирующих органов и чувствительные структуры (шипики). Расположение структур на цефалоне, как и проявление любого признака находится в зависимости от двух факторов, генетического и средового. Мы предполагали, что общее количество этих структур зависит от генотипа, а уровень показателя стабильности развития (показатели ФА) — от факторов внешней среды.

Согласно методическим рекомендациям [2003] показатели ФА начиная с которых можно судить о нарушениях нормального развития для разных организмов варьируются от 0,3 до 0,5. В настоящее время говорить об уровне нарушений стабильности развития у ракообразных не представляется возможным, так как накопленный на данный момент объем данных не позволяет построить

для этой группы балльную шкалу. Хотя средний показатель ФА северной выборки (0,42) несколько выше, чем у южной (0,34), статистические критерии не выявил между ними достоверных различий.

Выборки *E. baikalensis* из южной и северной котловин не имеют достоверных отличий ($p > 0,05$) ни по общему количеству структур на исследованных областях цефалона, ни по показателям асимметрии. При этом наблюдается большой разброс в количества структур в обеих выборках. В целом наблюдается низкий уровень асимметрии в выборках при сильном разбросе значений признака, что может являться следствием высокого генетического полиморфизма эпишуры. Эти выводы подтверждаются и результатами молекулярно-генетического анализа фрагмента COI. Имеющиеся литературные данные о высоком полиморфизме транскриптомов ряда ядерных генов, отвечающих за приспособление *E. baikalensis* к температурным условия [Bowman et al., 2018], также хорошо согласуются с нашими выводами. Отсутствие статистически значимой разницы между выборками по общему количеству структур говорит в пользу единства популяции *E. baikalensis* в Байкале и подтверждает выводы, сделанные на основе молекулярно-генетического анализа по фрагменту COI.

Котловины Байкала могут значительно отличаться по составу и биомассе фитопланктона, периоду его цветения и опускания, а также температурному режиму. Из-за постоянно меняющихся, не только от сезона к сезону, но и от года к году условий обитания, на выживаемость *E. baikalensis* может оказываться разнонаправленное давление отбора. В разных районах Байкала, под влиянием внешних факторов, могут получать преимущество особи с теми или иными гаплотипами, что влияет на их выживаемость. Регулярный перенос течениями особей *E. baikalensis* между районами Байкала приводит, по-видимому, к формированию высокополиморфной гетерогенной популяции. Высокий полиморфизм здесь может быть с одной стороны следствием разнообразия внешних условий, с которыми приходится сталкиваться рачку, с другой стороны механизмом, позволяющим к ним приспосабливаться. Весьма вероятно, что

расположение шипиков – как сенсорных структур и пор – как секреторных, находятся в определенной зависимости от влияния внешних условий.

4.2.2. Ротовые конечности

Как показали молекулярно-генетические датировки по фрагменту COI, разошлись исследованные виды довольно давно, более 8 млн. лет назад. За это время у обоих видов сформировались морфологические особенности, характеризующие специализацию к средам их обитания.

Среди таких особенностей строение ротовых конечностей исследуемых видов. Так *E. baikalensis* имеет ротовые конечности значительно длиннее, чем *E. chankensis*. Первые и вторые максиллы *E. baikalensis* за счет большей длины имеют и большую покрываемую конечностями площадь (Приложение VIII), I максиллы примерно в 5 раз, II максиллы в 2 раза.

Известно, что копеподы обнаруживают гидромеханические и химические раздражители, используя специализированные органы, расположенные на антеннах, ротовых частях и поверхности тела [Strickler, Bal, 1973; Huys, Boxshall, 1991; Neuschele, Selander, 2014]. Длина конечности дает преимущество в хеморецепции, так как хеморецепция происходит в основном при касании [Vanderploeg, Paffenhofer, 1985]. При мелкой и малочисленной пище выгодней длинные конечности и невысокая скорость их движения. При длинной конечности больше дальность детекции частиц и площадь захвата. При крупной и многочисленной пище для осуществления захвата нужны короткие конечности. Соответственно, обнаруженная значительная разница в длине ротовых придатков двух видов является следствием приспособления к обитанию в разных по динамике пищевых ресурсов водоемах. Равно и время существования в данных условиях было достаточным для приобретения обозначенных приспособлений.

Строение мандибул. Максимальное относительное содержание кремния в зубных коронках мандибул *E. baikalensis* (39%) превышает таковое у *E. chankensis* (11%). Озеро Байкал является олиготрофным водоемом с массовым развитием в весеннем и осеннем планктоне диатомовых водорослей, доминирующим видом

среди которых является толстостенная *Aulacoseira baikalensis* (K. Meyer) Simonsen [Поповская и др., 2002]. Высокое содержание кремния в коронках *E. baikalensis* позволяет консументу фрагментировать длинные (до 1-2 мм) нитчатые колонии диатомеи *A. baikalensis*, которые она потребляет в пищу [Шевелева и др. 1992]. Нагрузка на режущий край мандибулы *E. baikalensis* столь велика, что островершинные зубцы стираются, а коронка часто обламывается, обнажая острое возвышение. Эта структура, скорее всего, является каналом, по которому происходит выделение кремний-содержащего секрета для ее построения [Miller et al., 1990]. По всей видимости, коронки с высоким содержанием Si являются приспособлением реликтовой *E. baikalensis* к питанию диатомеями – основными первичными продуцентами оз. Байкал. Исходя из простого строения режущего края мандибул *E. chankensis*, можно предположить, что для потребления в пищу диатомовых водорослей этому виду не требуется прилагать больших усилий для их измельчения. Действительно, в озере Ханка массовым и доминирующим видом весеннего планктона является тонкостенная диатомея *Aulacoseira islandica* (O.Müller) Simonsen, 1979 [Усольцева и др. 2006]. По нашим наблюдениям, кремнистые панцири этой диатомеи сминаются даже при высушивании образцов фитопланктона. Таким образом, по морфологии мандибул, и по потребляемой пище *E. baikalensis* и *E. chankensis* существенно различаются между собой.

Содержание кремния может являться не только важным показателем экологической приспособленности видов к трофическим особенностям, но и видоспецифичным признаком. Так близкие виды могут значительно отличаться по содержанию кремния в вентральных зубцах мандибул, что имеет место не только у азиатских, но и у американских представителей рода *Epischura*: *E. lacustris* и *E. nevadensis* [Naumova et al., 2015], а также на примере еще одних представителей семейства Temoridae: *Eurytemora lacustris* и *Eurytemora velox* [Вежновец и др. 2012].

Относительно строения мандибул стоит вспомнить и еще один показатель - Индекс Ито, который использовался как один из критериев для построения деревьев в недавней работе посвященной филогении рода [Bowman et al., 2019].

На наш взгляд — это не совсем уместный для филогенетических построений показатель, так как на примере *Eurytemora lacustris* [Slugocki, 2019] описано, что данный показатель может сильно варьировать даже внутри одного вида, в зависимости от пола, возраста, сезона и условий питания. Соответственно, основываясь на таком показателе возможность выделения азиатских представителей рода *Epischura* в отдельный род - не уместно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые проведен анализ популяционно-видовой структуры на основе молекулярно – генетических маркеров (COI, ITS1) азиатских представителей рода *Epischura* (*E. baikalensis* и *E. chankensis*). Для анализируемых видов построено филогенетическое дерево на основе уникальных гаплотипов с помощью Байесовского метода с молекулярными часами. Проведена реконструкция изменения эффективной численности популяций методом Байесовского скайплота (Bayesian Skyline Plot). Время расхождения между *E. baikalensis* и *E. chankensis*, которое на филогенетическом древе составило 13,71 млн. лет (ДИ: 8,34 - 21,42 млн. лет), совпало с имеющимися в литературе датировками $14,81 \pm 0,88$ млн. лет [Bowman, 2019], полученными по ядерным генам, что говорит в пользу используемых нами калибровок. Полученные датировки говорят о продолжительном не менее 8 млн. лет существовании представителей рода *Epischura* на территории Азии.

Популяционные исследования митохондриальных (COI) и ядерных (ITS1) нуклеотидных последовательностей показали, что: несмотря на большую протяженность озера Байкал, глубину, разделение поднятиями дна на котловины, а также наличие отличающихся по размеру взрослых особей у различных генераций *E. baikalensis*, для данного вида не наблюдается какой-либо генетической подразделенности в озере. На филогенетическом древе уникальные гаплотипы *E. baikalensis* образуют единый кластер без внутренней подразделенности со временем коалесценции 0,58 млн. лет с 95% доверительным интервалом 0,37 – 0,89 млн. лет. Популяция данного рачка является единой панмиксной и полиморфной, что подтверждается и результатами анализа структур интегумента.

Использование помимо молекулярно-генетических инструментов исследования еще и морфологических методов, позволило яснее интерпретировать полученные данные. Так, проведенные морфологические исследования строения ротовых конечностей показывают, что *E. baikalensis*, имеет высокую приспособленность к обитанию в условиях олиготрофного

водоема, когда пищевые объекты могут встречаться довольно редко. В контексте подобной приспособленности, вполне объясним рост численности, выявленный с помощью анализа гаплотипов фрагмента гена COI и приходящийся на период оледенений, когда трофность водоема снижалась. В условиях значительного снижения трофности водоема экспансия рачка в озере являлась, по-видимому, следствием освобождения экологической ниши, произошедшей за счет изменений и вымираний, вызванных ледниковыми эпохами, свое воздействие могло оказать и шедшее в этот период увеличение глубин озера, которое могло быть связано с температурным режимом озера и его трофностью. Высокий полиморфизм популяции, выявленный на основе генетических и морфологических маркеров, также позволяет *E. baikalensis* выживать в изменчивых условиях Байкала.

Популяция *E. chankensis* из озера Ханка хоть и представлена сейчас единой популяцией – обнаруживает следы некогда существовавшей подразделенности, начало которой датируется 0,69 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,39 – 1,06 млн. лет. Подразделенность, возможно, связана с географической изоляцией имевшей место в прошлом. Географическая изоляция, исходя из примененных датировок, относится ко времени до появления в Ханкайской котловине единого водоема, но существования речной сети и ряда небольших озер. Экспансия *E. chankensis*, вероятно, связана с изменениями размеров занимаемых ею в то время водоемов, в дальнейшем образовавших единый водоем в Ханкайской котловине.

Перспективным кажется дополнить исследование представителями *E. chankensis* из других водоемов Дальнего Востока, а также добавить представителей *E. smirnovi*, описанных в озере Чля и в нижнем течении р. Амур у пос. Тыр.

Что касается флуктуирующей асимметрии, имеет смысл измерить ее показатели для особей *E. baikalensis* из нецентральных, прибрежных станций, особенно в районах поселений.

Т.к. анализ популяционной истории видов проливает свет на прошлое мест обитания, интерес может вызывать сопоставление эволюционной истории

исследованных видов с таковой у других представителей гидробионтов, обитающих в данных водоемах.

ВЫВОДЫ

1. Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей гена COI мтДНК и ITS1 рДНК выявил у ныне единой популяции *E. chankensis* в озере Ханка следы генетической подразделенности. Разделение выявленных групп гаплотипов *E. chankensis* произошло 0,69 млн. лет назад с 95% доверительным интервалом 0,39 – 1,06 млн. лет.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей гена COI мтДНК и ITS1 рДНК не подтвердил наличие пространственной и сезонной генетической подразделенности эпишуры в озере Байкал. *E. baikalensis* представлена единой панмиксной популяцией с высоким уровнем гаплотипического разнообразия мтДНК. Уникальные гаплотипы *E. baikalensis* образуют на филогенетическом дереве единый кластер без внутренней подразделенности со временем разделения от общего предка 0,58 млн. лет с 95% доверительным интервалом 0,37 – 0,89 млн. лет.

3. *E. baikalensis* и *E. chankensis* прошли через периоды резкого увеличения численности: интервалы времени для этих событий составили от 180 до 100 тыс. лет назад для *E. baikalensis* и 400 до 250 тыс. лет назад для групп *E. chankensis*.

4. Согласно молекулярным датировкам на основе последовательностей COI мтДНК время коалесценции для *E. baikalensis* и *E. chankensis* составило 14 млн. лет (95% ДИ: 8 - 21 млн. лет). Полученные данные полностью согласуются с имеющимися в литературе независимыми датировками для данного события, определенными по другим (ядерным) молекулярным маркерам.

5. Установлено что уровень кремния в мандибулярных зубцах и морфология ротовых конечностей у *E. baikalensis* и *E. chankensis* различаются. Максимальное относительное содержание кремния от общего содержания других элементов в коронках: *E. baikalensis* - 39 %, *E. chankensis* – 11 %. Первые и вторые максиллы (Mx1, Mx2) у *E. baikalensis* длиннее, чем у *E. chankensis*. Поэтому и площадь, покрываемая Mx2 у *E. chankensis*, в два раза меньше, чем у *E. baikalensis*. Площадь, которую охватывают Mx1, у этих видов различалась в пять раз.

6. Выявлен высокий разброс значений числа структур интегумента у *E. baikalensis* при низком уровне асимметрии в выборках, что подтверждает высокий генетический полиморфизм популяции. Отсутствие значимых отличий между выборками по числу структур свидетельствует о единстве популяции *E. baikalensis* в озере Байкал. Отсутствие значимых отличий по уровню флуктуирующей асимметрии между выборками говорит о сходном давлении факторов среды (абиотических и биотических) на южную и северную части популяции в центральных районах озера. Данный показатель можно использовать для оценки их комплексного воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 2. С. 307–331.
2. Алексеев В.Р., Наумова Е.Ю. Новый экспресс-метод исследования органов инкумента у копепод // Зоологический журнал. 2005. №84(2). С. 257–268.
3. Афанасьева Э.Л. Биология байкальской эпишуры. Новосибирск: Наука. Сиб отд-ние, 1977. 144 с.
4. Афанасьева Э.Л. Строение и онтогенез конечностей синцефалона у *Epischura baicalensis* Sars (Copepoda, Calanoida) // Черви, моллюски, членистоногие. – Новосибирск: Наука, 1989. С. 210–226.
5. Афанасьева Э.Л. Отряд Copepoda – веслоногие, подотряд Calanoida // Атлас и определитель пелагиобионтов Байкала. Новосибирск: Наука, 1995. С. 365–406.
6. Барабанщиков Е.И. Зоопланктон озера Ханка: динамика, распределение, продукция // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Владивосток: Дальнаука, 2001. Вып. 1. С. 195–204
7. Барабанщиков Е.И. Зоопланктон озера Ханка: автореф... дис. кан. биол. наук. – СПб.: 2004. – 24 с.
8. Беклемишев К.В. К анатомии жевательного аппарата копепод // Труды Института Океанологии. 1959. Т. 30. С. 148–155.
9. Боруцкий Е.В. О новом виде *Epischura* из бассейна Амура (*Epischura udylensis* sp. n. Copepoda, Calanoida) // Доклады Академии Наук СССР. 1947. Т. 53, № 7. С. 1513–1515.
10. Боруцкий Е.В., Степанова Л.А., Кос М.В. Определитель Calanoida пресных вод СССР. Л.: Наука, 1991. – 504 с.
11. Букин Ю.С., Петунина Ж.В., Щербаков Д.Ю. Механизмы формирования внутривидового генетического разнообразия у байкальской эндемичной амфиподы *Gmelinoides fasciatus*: связь популяционных процессов с палеоклиматической историей озера // Генетика. 2018. Т. 54, № 9. С. 1036–1046.

12. Вежновец В.В., Зайдыков И.Ю., Наумова Е.Ю., Сысова Е.А. Особенности биологии двух видов копепод (Crustacea, Copepoda, Calanoida) как возможные причины изменения их ареалов // Российский журнал биологических инвазий. 2012. № 2. С. 16–29.

13. Верболов В.И., Сокольников В.М., Шимараев М.Н. Гидрометеорологический режим и тепловой баланс озера Байкал. М.: «Наука», 1965. – 371 с.

14. Вилисова И.К. Зоопланктон" Малого моря // Труды Байкальской, лимнологической станции Академии Наук СССР. 1959. Т. 3. С. 275–304

15. Вотинцев К.К., Афанасьева Э.Л. Об использовании первичной продукции Байкала организмами первого гетеротрофного уровня // Доклады Академии Наук СССР. 1968. 178, 2. С. 455–457

16. Гелашвили Д.Б., Якимов В.Н., Логинов В.В., Епланова Г.В. Статистический анализ флуктуирующей асимметрии билатеральных признаков разноцветной ящурки *Erenias arguta* // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии: Сборник научных трудов. 2004. Вып. 7. С. 45–69.

17. Гладенков А.Ю., Гладенков Ю.Б. Начало формирования межконтинентальных связей Пацифики и Арктики через Беренгов Пролив в неогене // Стратиграфия. Геологическая Корреляция. 2004. Т. 12, № 2. С. 72–89.

18. Гольдберг Е.Л., Чебыкин Е.П., Воробьева С.С., Грачев М.А. Урановый сигнал влажности палеоклиматов в осадках озера Байкал // Доклады Академии Наук. 2005. Т. 400, № 1. С. 72–77.

19. Зайдыков И.Ю., Кирильчик С.В., Наумова Е.Ю., Суханова Л.В. Следы генетической подразделенности в ныне единой популяции эпишуры озера Ханка – *Epischura chankensis* Rylov, 1928 (Copepoda, Calanoida) // Генетика. 2018. Т. 54, № 3. С. 369–372.

20. Зайдыков И.Ю., Майор Т.Ю., Суханова Л.В., Кирильчик С.В., Наумова Е. Ю. Полиморфизм мтДНК эпишуры озера Байкал - ключевого эндемичного вида планктонного сообщества // Генетика. 2015. Т. 51, № 9. С. 1087–1090.

21. Зайдыков И.Ю., Наумова Е.Ю. Тонкая морфология ротовых конечностей *Epischura chankensis* Rylov, 1928 (Copepoda, Calanoida) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. 2011. Вып. 5. С. 182–186.

22. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили А.Т. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.

23. Захаров В.М., Чубинишвили А.Т. Мониторинг здоровья среды на охраняемых природных территориях М.: Центр экологической политики России, 2001. 148 с.

24. Захваткин А.А. О вертикальном распределении и суточных миграциях зоопланктона в Байкале // Докл. Академии Наук СССР. 1930. № 6. С. 133–139.

25. Зорина А.А. Методы статистического анализа флуктуирующей асимметрии // Принципы экологии. 2012. №3. С. 24–47.

26. Карабанов Е.Б. Геологическое строение осадочной толщи озера Байкал и реконструкции изменений климата Центральной Азии в позднем кайнозое (на основе изучения байкальских осадков). Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора геол.-мин. наук – Москва, 1999. – 72 с.

27. Карта четвертичных образований масштаба 1:2 500 000 территории Российской Федерации. Пояснительная записка (Минприроды России, Роснедра, ФГУП «ВСЕГЕИ», ФГУП «ВНИИ Океангеология»). СПб., 2013. 220 с.

28. Квасов Д.Д. История Ладожского, Онежского, Псковско-Чудского озер, Байкала и Ханки (Серия: История озер СССР)/ Д. Д. Квасов, Г. Г. Мартинсон, А. В. Раукас (ред.). Л.: Наука., 1989. 280 с.

29. Кожов М.М. Вертикальное распределение планктона и планктоноядных рыб озера Байкал // Вопр. ихтиологии. 1954. Вып. 2. С. 7–20.

30. Кожов М.М. Биология озера Байкал. М: Изд-во АН СССР, 1962. 312 с.

31. Кожова О.М. Питание *Epischura baicalensis* Sars (Copepoda, Calanoida) в оз. Байкал // Доклады Академии Наук СССР. 1953. Т. 90, № 2. С. 299–301.

32. Кожова О.М. К биологии *Epischura baicalensis* Sars (Copepoda, Calanoida) в оз. Байкал // Известия Биолого-Географического Института при Иркутском Государственном Университете. 1956. Т. 90, № 2. С. 299–301.

33. Коноплева Г.Д. Зависимость между индексом усвоения и концентрацией водорослей у *Epischura baicalensis* // Трофические связи и их роль в продуктивности природных водоемов. М, 1983. С. 40–43.

34. Короткий А.М., Караулова Л.П., Белянина Н.И., Павлюткин Б.И. Четвертичные озерные трансгрессии в Уссури-Ханкайской впадине // Позднекайнозойская история озёр в СССР. К XI Конгрессу ИНКВА в СССР. Новосибирск: Наука, 1982. С. 109–117.

35. Короткий А.М., Гребенникова Т.А., Караулова Л.П., Белянина Н.И. Озерные трансгрессии в позднекайнозойской Уссури-Ханкайской депрессии (Приморье) // Тихоокеанская геология. 2007. Т. 26, № 4. С. 53–68.

36. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов — 4-е издание, переработанное и дополненное. М: Высшая школа, 1990. 352 с.

37. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ, 2009. 256 с.

38. Лухтанов В.А. Принципы реконструкции филогенезов: признаки, модели эволюции и методы филогенетического анализа // Труды Зоологического Института РАН. Прил. № 2. 2013. С. 39–52.

39. Логачев Н.А. История и геодинамика Байкальского рифта // Геология и геофизика. 2003. Т.44, № 5. С. 391–406.

40. Мац В.Д., Уфимцев Г.Ф., Мандельбаум М.М. и др. Кайнозой Байкальской рифтовой впадины: строение и геологическая история. Новосибирск: Издательство СО РАН, филиал «Гео», 2001. 252 с.

41. Мац В.Д., Щербаков Д.Ю. Геологическое развитие Байкальского региона и формирование уникального биоразнообразия Байкала // Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле: материалы научно-практической конференции. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2008. С. 155–175.

42. Мельник Н.Г. Итоги исследования зоопланктона Байкала // Атлас и определитель пелагиобионтов Байкала. Новосибирск: Наука, 1995. С. 73–104.

43. Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России / Под ред. В.Р. Алексеева, С.Я. Цалолихина. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. Т.1. 495 с.

44. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур). Распоряжение Росэкологии от 16.10.2003. № 460–р. М., 2003. 28 с.

45. Микишин Ю.А., Петренко Т.И., Попов А.Н., Орлова Л.А. Палеогеография озера Ханка в позднем Голоцене // Научное обозрение. 2007. № 2. С. 7–13.

46. Монаков А.В. Питание и пищевые взаимоотношения пресноводных копепод II. – Л.: Наука, 1976. 170 с.

47. Монченко В.И. 2001. О дифференциальной галопатии семейств свободноживущих Copepoda Cyclopoidea // Вестник зоологии. 2001. Т.35, № 5. С.3–7.

48. Наумова Е.Ю. Жизненные циклы и морфология представителей рода *Epishura* Forbes, 1882 (Copepoda: Calanoida): автореф... дис. кан. биол. наук. Иркутск: 2006. – 23 с.

49. Наумова Е.Ю., Барабанщиков Е.И. К вопросу о питании *Epischura chankensis* Rylov, 1928 (Copepoda, Calanoida) в озере Ханка // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Владивосток: Дальнаука, 2008. Вып. 4. С. 252–257.

50. Наумова Е.Ю., Зайдыков И.Ю. Опыт применения флуктуирующей асимметрии у ракообразных для оценки влияния экологических и популяционных факторов // Вода: химия и экология. 2016. № 2. С. 89–93.

51. Наумова Е.Ю., Зайдыков И.Ю. Сравнительный анализ строения ротовых конечностей двух видов рода *Epischura* (Copepoda, Calanoida) из озер с разным

трофическим статусом // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. 2020. Т. 13, № 4. С. 453–463.

52. Павлов И.Я. Введение в современную филогенетику (кладогенетический аспект) // М.: изд-во КМК, 2005. 192с.

53. Павлюткин Б.И., Пушкарь В.С., Черепанова М.В., Петренко Т.И. Проблемы стратиграфии миоцена приханкайской впадины (Дальний Восток России) // Тихоокеанская геология Т. 23, №4. 2004. С. 73–85.

54. Поповская Г.И., Генкал С.И., Лихошвай Е.В. Диатомовые водоросли планктона озера Байкал. Наука: Новосибирск, 2002. 168 с.

55. Смирнов С.С. *Epischura baicalensis* q.o. Sars на Камчатке (Crustacea, Soropoda) // Труды Зоологического Института. 1936. Т. III. С. 59–65.

56. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.

57. Усольцева М.В., Никулина Т.В., Юрьев Д.Н., Лихошвай Е.В. К изучению развития и морфологических особенностей *Aulacoseira islandica* (O. Müller) Simonsen (Bacillariophyta) // Альгология. 2006. Т. 16, №2 С. 145–155.

58. Филимонов В.С., Апонасенко А.Д. Сезонная динамика содержания взвешенного вещества в водах озера Ханка // Оптика атмосферы и океана. 2013. Т.26, № 2. С. 124–131.

59. Хурсевич Г.К., Карабанов Е.Б., Прокопенко А.А., Вильямс Д.Ф., Кузьмин М.И., Феденя С.А., Гвоздков А.Н., Кербер Е.В. Детальная диатомовая биостратиграфия осадков озера Байкал в эпоху Брюнес и климатические факторы видообразования // Геология и геофизика. 2001. Т. 42, №1–2. С. 108–129.

60. Шевелева Н.Г., Логачева Н.Ф., Балаян А.Э., Зубарева Л.Д. Количественные аспекты питания байкальской эпишуры // Гидробиологический журнал. 1992. Т.28, № 6. С.19–23.

61. Шевелева Н.Г., Пастухов М.В. Зоопланктон Братского водохранилища // Бюлетень Московского Общества Испытателей Природы. Отдел Биологии 2009.Т.114, №6. С.9–14.

62. Шевелева Н.Г., Поповская Г.И., Пастухов М.В., Алиева В.И. Оценка современного состояния зоопланктона заливов Братского водохранилища // Бюлетень Московского Общества Испытателей Природы. Отдел Биологии. 2012. Т.117, №4. С.37–47.

63. Шимараев М.Н., Гранин Н.Г., Домышева В.М., Жданов А.А., Голобокова Л.П., Гнатовский Р.Ю., Цехановский В.В., Блинов В.В. О межкотловинном водообмене в Байкале // Водные ресурсы. 2003. Т. 30, № 6. С. 678 –681.

64. Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Transactions on Automatic Control. 1974. Vol. 19, №. 6. P. 716–723.

65. Avise J.C. Phylogeography: the history and formation of species. USA: Harvard University Press, 2000. 447 p.

66. Baek S.Y., Jang K.H., Choi E.H., Ryu S.H., Kim S.K., Lee J.H., Lim Y.J, Lee J., Jun J., Kwak M., Lee U.-S., Hwang J.-S., Maran B.A.V., Chang C.Y., Kim I.-H., Hwang U.-W. DNA Barcoding of metazoan zooplankton copepods from South Korea // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, №7: e0157307. doi:10.1371/journal.pone.0157307

67. Bandelt H-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular Biology and Evolution. 1999. Vol. 16. P. 37–48.

68. Bitsch C., Bitsch J., Phylogenetic relationships of basal hexapods among the mandibulate arthropods: a cladistic analysis based on comparative morphological characters // Zoologica Scripta. 2004. Vol. 33. P.511–550.

69. Blanco-Bercial L., Bradford-Grieve J., Bucklin A. Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea: Copepoda) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011 Vol.59, №1. P.103–13. doi: 10.1016/j.ympev.2011.01.008. Epub 2011 Jan 31.

70. Bowman T.E. *Epischura fluviatilis* Herrick, 1883 (Copepoda: Calanoida: Temoridae), first report from South Carolina, with notes on sexual dimorphism in the caudal rami and its possible role in mating // Journal of Crustacean Biology. 1991. Vol. 11, №3. P. 460–462.

71. Bowman L.L., Kondrateva E.S., Silow E.A., Wilburnc P., Yampolsky L.Y. A capital breeder in a heterogeneous environment: Lipid reserves and RNA:DNA ratio in

Lake Baikal's endemic *Epischura* // *Journal of Great Lakes Research*. 2017. Vol. 43. P.280–288.

72. Bowman L.L., Kondrateva E.S., Timofeyev M.A., Yampolsky L.Y. Temperature gradient affects differentiation of gene expression and SNP allele frequencies in the dominant Lake Baikal zooplankton species // *Molecular Ecology*. 2018. P.1–16.

73. Bowman L.L., MacGuigana D.J., Gorchelsb M.E., Cahillaneb M.M., Moore M.V. Revealing paraphyly and placement of extinct species within *Epischura* (Copepoda: Calanoida) using molecular data and quantitative morphometrics.// *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019. Vol. 140, 106578

74. Boxshall G., Halsey Sh.A. *An introduction to Copepod Diversity* // London: Natural History Museum, 2004. 2000 p.

75. Bos D.H., Posada D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees // *Developmental and Comparative Immunology*. 2005. Vol. 29. P. 211–227.

76. Bradford-Grieve J.M., Boxshall G.A., Blanco-Bercial L. Revision of basal calanoid copepod families, with a description of a new species and genus of Pseudocyclopidae // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2014. Vol. 171, P. 507–533.

77. Browne W.F, Patel N.H. Molecular genetics of crustacean feeding appendage development and diversification // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2000. Vol. 11. P. 427–435.

78. Bron J.E., Frisch D., Goetze E., Johnson S.C., Lee C.E., Wyngaard G.A. Observing copepods through a genomic lens // *Frontiers in Zoology*. 2011. Vol. 8, №22. 15p. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-8-22>

79. Brown W.M., George M., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1979. Vol. 76. P.1967–1971.

80. Bucklin A., Bentley A.M., Franzen S.P. Distribution and relative abundance of *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda: Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species // *Marine Biology*. 1998. Vol.132. P. 97–106.

81. Bucklin A., Frost B., Bradford-Grieve J., Allen L., Copley N. Molecular systematic assessment of thirty-four calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae using DNA sequences of mtCOI and nuclear 18S rRNA // *Marine Biology*. 2003. Vol. 142. P. 333–343.

82. Burton R.S. Intraspecific phylogeography across the point conception biogeographic boundary // *Evolution*. 1998. Vol. 52, №3. P. 734–745.

83. Capua I.D., Maffucci F., Pannone R., Mazzocchi M.G., Biffali E., Amato A. Molecular phylogeny of Oncaeidae (Copepoda) using nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) // *PLoS ONE*. 2017. Vol.12, №4: e0175662. 21p. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175662>

84. Cockerham C.C. Analyses of gene frequencies // *Genetics*. 1973. Vol. 74. P. 679–700.

85. Cummings M.P., Handley S.A., Myers D.S., Reed D.L., Rokas A., Winka K. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case // *Systematic Biology*. 2003. Vol. 52, №4. P. 477–487.

86. Dahl E., Hessler R.R. The crustacean *lacinia mobilis*: a reconsideration of its origin, function and phylogenetic implications // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1982. Vol. 74. P. 133–146.

87. Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods*. 2012. Vol. 9, №8. P.772.

88. De Stasio B.T. The role of dormancy and emergence patterns in the dynamics of a freshwater zooplankton community // *Limnology and Oceanography*. 1990. V.35, №5. P. 1079–1090.

89. Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence // *PLoS Biol*. 2006. Vol.4, e88.

90. Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B.E. T.H., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences // *Molecular Biology and Evolution*. 2005. Vol. 22, №5. P. 1185–1192.

91. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // *BMC Evolutionary Biology*. 2007. Vol. 7, №214. 8p. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

92. Dussart B.H., Defaye D. Repertoire mondial des Crustaces Copepodes des eaux interieures. I. Calanoides. ed. Paris: CNRS, 1983. 224 p

93. Dussart B.H., Defaye D. Introduction to the Copepoda. (2nd Edition) // H. Dumont (Ed.), *Guide to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Leiden: Backhuys Publishers, 2001. Vol. 7. 277p.

94. Eck R.V., Dayhoff M.O. Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences // *Science*. 1966. Vol. 152. P.363–365.

95. Fay J.C., Wu C.I. Hitchhiking under positive Darwinian selection // *Genetics*. 2000. Vol. 155, №. 3. P. 1405–1413.

96. Felgenhauer B. Techniques for preparing crustaceans for scanning electron microscopy// *Journal of Crustacean Biology*. 1987. Vol. 7, №1. P. 71–76.

97. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // *Journal of Molecular Evolution*. 1981. Vol. 17. P. 368 – 376.

98. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. Vol. 39. P. 783–791.

99. Figueroa D.F. Phylogenetic analysis of *Ridgewayia* (Copepoda: Calanoida) from the Galapagos and of a new species from the Florida Keys with a reevaluation of the phylogeny of Calanoida // *Journal of Crustacean Biology*. 2011. Vol. 31, № 1. P. 153–165.

100. Fitch W.M. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology // *Systematic Zoology*. 1971. Vol. 20. P. 406–416.

101. Fleminger A. Patterns, number, variability and taxonomic significance of intergumental organs (sensilla and granular pores) in the genus *Eucalanus* (Copepoda, Calanoida) // *Fishery bulletin*. 1973. V. 74, №4. P. 965–1011.

102.Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.// *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. № 3. P. 294–299.

103.Gernhard T. The conditioned reconstructed process // *Journal of Theoretical Biology*. 2008. Vol. 253, №4, P. 769–778.

104.Giesecke R., Gonzalez H., Mandible characteristics and allometric relations in copepods: a reliable method to estimate prey size and composition from mandible occurrence in predator guts// *Revista Chilena de Historia Natural*. 2004. Vol. 77. P. 607–616.

105.Goetze E. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae // *Proceedings of the Royal Society*. 2003. Vol. 270. P. 2321–2331.

106.Grubbs F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples // *Technometrics*. 1969. Vol. 11, № 1. P. 1–21.

107.Hairston N.G., DeStasio B.T. Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool // *Nature*. 1988. Vol. 336. P.239–242.

108.Hampel F.R. The influence curve and its role in robust estimation // *Journal of the American Statistical Association*.1974. Vol. 69, № 346. P. 383–393.

109.Harris D.J., Crandall K.A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies // *Molecular Biology and Evolution*. 2000. V. 17. P. 284–291.

110.Harst G.D., Jiggins F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts// *Proceedings of the Royal Society*. 2005. Vol. 272, № 1572. P. 1525–1534

111.Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *Journal of Molecular Evolution*. 1985. Vol. 22. P. 160–174.

112.Havermans C., Sonet G., d’Udekem d’Acoz C., Nagy Z.T., Martin P., Brix S., Riehl T., Agrawa S., Held C. Genetic and morphological divergences in the cosmopolitan deep-sea amphipod *Eurythenes gryllus* reveal a diverse abyss and a

bipolar species // PLoS ONE. 2013. Vol.8, №9: e74218. 15p.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074218>

113.Hedges L. Modeling publication selection effects in meta-analysis // Statistical Science. 1992. Vol. 7, № 2, P. 246–255.

114.Hennig W. Phylogenetic systematics. // University of Illinois Press, 1966. — 263 p.

115.Heuschele J., Selander E. The chemical ecology of copepods // Journal of Plankton Research. 2014. Vol.36, №4. P. 895–913.

116.Hillis D.M., Davis S.R. Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction // Systematic Biology. 1988. Vol. 37. P. 63–66.

117.Hillis D.M., Dixon M.T. Minimal genetic variation in a morphologically diverse species (Florida tree snail, *Liguus fasciatus*) // The Quarterly Review of Biology. 1991. Vol. 66. P. 411–453.

118.Holm M.W., Kiorboe T., Brun P., Licandro P., Almeda R., Hansen B.W. Resting eggs in free living marine and estuarine copepods // Journal of Plankton Research. 2018. Vol. 40, №1. P. 2–15.

119.Hopp U., Maier G. Implication of the feeding limb morphology for herbivorous feeding in some freshwater cyclopoid copepods // Freshwater Biology. 2005. Vol.50. P. 742–747.

120.Humes A.G. The postembryonic developmental stages of a fresh-water Calanoid Copepod, *Epischura massachusettsensis* Pearse // Journal of Morphology. 1955. Vol. 12, № 3. P. 441–472.

121.Huys R., Boxshell G. Copepod evolution. // The Ray ' Society, 1991. Vol. 159. 468 p.

122.Itoh K. A consideration on feeding habits of planktonic copepods in relation to the structure of their oral parts // Bulletin of Plankton Society of Japan. 1970. №17. P.1–10.

123.Jiang H., Osborn T.R., Meneveau C. The flow field around a freely swimming copepod in steady motion. Part I: Theoretical analysis // Journal of Plankton Research. 2002. Vol. 24, №3. P. 167–189

124.Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism // New York: Academic Press, 1969. P. 21–132.

125.Khodami S., McArthur J., Blanco-Bercial L., Martinez P., Arbizu P.M. Molecular Phylogeny and Revision of Copepod Orders (Crustacea: Copepoda)// Scientific Reports. 2017. Vol.7, № 1: 9164. 11p. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06656-4>

126.Ki J.-S., Lee K.W., Park H.G., Chullasorn S., Dahms H.U., Lee J.S. Phylogeography of the copepod *Tigriopus japonicus* along the Northwest Pacific rim // Journal of Plankton Research. 2009. Vol. 31, № 2. P. 209–221.

127.Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16. P. 111–120.

128.Knowlton N., Weight L.A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama // Proceedings of the Royal Society. 1998. Vol. 265. P. 2257–2263.

129.Kochanova E.S., Fefilova E.B., Sukhikh N.M., Velegzhaninov I.O., Shadrin D.M., Pylina Ya.I., Alekseev V.R. Morphological and molecular-genetic polymorphism of *Canthocamptus staphylinus* Jurine (Harpacticoida, Copepoda, Crustacea) // Inland Water Biology. 2018. Vol. 11, №. 2, P. 111–123.

130.Komsta L. Processing data for outliers // R News. Vol. 6, № 2. P. 10–13. <http://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>

131.Laakmann S., Gerdts G., Erler R., Knebelsberger T., Martínez Arbizu P., Raupach M.J. Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences // Molecular Ecology Resources. 2013. Vol.13, №5. P. 862–876.

132.Laforsch C, Tollrian R. A new preparation technique of daphnids for scanning electron microscopy using hexamethyldisilazane // Archiv fur Hydrobiologie. 2000. Vol.149 P.587–596.

133.Lajus D., Alekseev V. Components of morphological variation in Baikalian endemial cyclopid *Acanthocyclops spinifer* complex from different localities // Hydrobiologia. 2000. V.417. P. 25–35.

134.Lee C.E. Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate «populations» // Evolution. 2000. V.54. P. 2014–2027.

135.Li W.-H. Molecular evolution // Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1997. 487 p.

136.Liao W., Hong S.H., Chan B.H., Rudolph F.B., Clark S.C., Chan L. Apobec-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999. Vol. 260, №2. P.398–404.

137.Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol.25. P.1451–1452.

138.Lightowers R.N., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease // Trends in Genetics. Vol.13. P.450–455.

139.Madhupratap M., Nehring S., Lenz J. Resting eggs of zooplankton (Copepoda and Cladocera) from the Kiel Bay and adjacent waters (southwestern Baltic) // Marine Biology. 1996. Vol. 125. P. 77–87.

140.Makarov M.M., Kucher K.M., Naumova E.Yu. Vertical distribution of zooplankton after rapid change in temperature and chlorophyll concentration // Limnology and Freshwater Biology. 2019. Vol.1. P. 177–180.

141.Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. // Annals of Mathematical Statistics. 1947. №18. P. 50–60.

142.Marincovich L.Jr., Brouwers E.M., Hopkins D.M., McKenna M.C. Late Mesozoic paleogeographic and paleoclimatic history of the Arctic Ocean Basin, based on shallow-water marine faunas and terrestrial vertebrates //: Grantz A., Johnson L., Sweeney J.F. (Eds.), The Arctic Ocean region. The Geology of North America. Geol. Soc. Amer., Boulder, Colorado, 1990. P. 403–426.

143.Michels J., Gorb S. Mandibular gnathobases of marine planktonic copepods – feeding tools with complex micro- and nanoscale composite architectures // Beilstein Journal of Nanotechnology. 2015. Vol.6. P. 674–685.

144.Miller Ch.B., Huntley M.E., Brooks E.R. Morphogenesis of opal teeth in calanoid copepods // Marine Biology. 1990. Vol.106. P. 91–101.

145.Miller M.P., Bellinger R.M., Forsman E.D., Haig S.M. Effects of historical climate change, habitat connectivity and vicariance on the genetic structure and diversity across the range of the red tree vole (*Phenacomys longicaudus*) // Molecular Ecology. 2006. №15. P. 145–159.

146.Miyamoto M.M., Cracraft J. Phylogenetic inference, DNA sequence analysis, and the future of molecular systematics // Phylogenetic Analysis of DNA Sequences. Oxford University Press, New York, 1991. P 3–17.

147.Moore M.V., De Stasio B.T., Huizenga K.N., Silow E.A. Trophic coupling of the microbial and the classical food web in Lake Baikal, Siberia // Freshwater Biology. 2019. №64. P.138–151.

148.Mora M.S., Lessa E.P., Cutrera A.P., Kittlein M.J., Vasallo A.I. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat specific histories // Molecular Ecology. 2007. №16. P. 3453–3465.

149.Moriyama E.N., Powell J.R. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: mitochondrial versus nuclear genes // Journal of Molecular Evolution. 1997. №45. P. 378–391.

150.Naumova E.Yu., Alekseev V.R. How many generations does *Epischura baikalensis* (Copepoda, Calanoida) have in lake Baikal? // Crustaceana. 2020. – Vol. 93. P. 507–518.

151. Naumova E.Yu., Zaidykov I.Yu., Tauson V.L., Likhoshway Ye.V. Features of the Fine Structure and Si Content of the Mandibular Gnathobase of Four Freshwater Species of *Epischura* (Copepoda: Calanoida) // *Journal of Crustacean Biology*. 2015. Vol. 35, № 6. P. 741–746.

152. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations // *Annals of Human Genetics*. 1977. Vol. 41. P. 225–233.

153. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1979. Vol. 76. P. 5269–5273.

154. Nishida S., Ohtsuka S. Specialized feeding mechanism in the pelagic copepod genus *Heterorhabdus* (Calanoida: Heterorhabdidae), with special reference to the mandibular tooth and labral glands // *Marine Biology*. 1996 v.126. P. 619–632.

155. Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program Distributed by the Author // *Bioinformatics*. 2004. №24. P. 581–583.

156. Odorico D.M., Miller D.J. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution // *Molecular Biology and Evolution*. 1997. Vol. 14, № 5. P. 465–473.

157. Ohtsuka S., Onbe T. Relationship between mouthpart structures and in situ feeding habits of species of the family Pontellidae (Copepoda: Calanoida) // *Marine Biology*. 1991. Vol. 111. P. 213–225.

158. Ohtsuka S., Huys R. Sexual dimorphism in calanoid copepods: morphology and function // *Hydrobiologia*. 2001. Vol. 453/454. P. 441–466.

159. Parkin E.J., Butlin R.K. Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow *Grasshopper chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. V. 21, №8 P. 1595–1601.

160. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging // *Molecular Biology and Evolution*. 2008. Vol.25, №7. P.1253–1256.

- 161.** R Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. 2020. <https://www.R-project.org>.
- 162.** Radhika R., Bijoy Nandan S., Harikrishnan M. Morphological and molecular identification of marine copepod *Dioithona rigida* Giesbrecht, 1896 (Crustacea:Cyclopoida) based on mitochondrial COI gene sequences, from Lakshadweep sea, India // Mitochondrial DNA Part A. 2017. Vol. 28, № 6. P. 872–879.
- 163.** Ramos-Onsins S.E., Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth // Molecular Biology and Evolution. 2002. Vol. 19, № 12. P. 2092–2100.
- 164.** Raupach M.J., Mayer C., Malyutina M., Wägele J-W. Multiple origins of deep-sea Asellota (Crustacea: Isopoda) from shallow waters revealed by molecular data // Proceedings of the Royal Society B. 2009. Vol. 276. P. 799–808.
- 165.** Reed K.M., Hackett J.D., Phillips R.B. Comparative analysis of intra-individual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons // Gene. 2000. Vol. 249. P. 115–125.
- 166.** Revis N., Castel J., Tackx M.L.M. Some reflections on the structure of the mandibleplate of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) // Hydrobiological Bulletin. 1991. Vol. 25, №1. P. 45–50.
- 167.** Rocha-Olivares A., Fleeger J. W., Foltz D. W. Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic Harpacticoid Copepod // Molecular Biology and Evolution. 2001. Vol. 18, № 6. P. 1088–1102.
- 168.** Rogers A.R., Harpending H.C. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Molecular Biology and Evolution. 1992. Vol. 9. P. 552–569.
- 169.** Romano P., Feletti M., Mariottini G.L., Carli A. Ecological and nutritional implications of the mandibular structure in the Antarctic calanoid copepod *Metridia gerlachei* Giesbrecht, 1902: an ultrastructural study // Polar Biology. 1999. Vol. 22. P. 7–12.

170. Rozas J., Sanchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P. 2496–2497.

171. Rowe L., Repasky R., Palmer R. Size-dependent asymmetry: fluctuating asymmetry versus antisymmetry and its relevance to condition-dependent signaling // *Evolution*. 1997. №. 51. P. 1401–1408.

172. Saito H., Kiørboe T. Feeding rates in the chaetognath *S. elegans*: effects of prey size prey swimming behavior and small-scale turbulence // *Journal of Plankton Research*. 2001. Vol. 23. P. 1385–1398.

173. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4. P. 406–425.

174. Sajdak S.L., Phillips R.B. Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1997. Vol. 54. P. 1494–1503.

175. Scholtz G., Mittmann B., Gerberding M. The pattern of Distal-less expression in the mouthparts of crustaceans, miriapods and insects: new evidens for a gnathobasic mandible and common orgin of Mandibulata // *The International Journal of Developmental Biology*. 1998. Vol. 42. P.801–810.

176. Schubart C.D., Diesel R., Hedges B. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs // *Nature*. 1998. Vol. 393. P. 363–365.

177. Schulze P.C., Folt C.L. Effects of conspecifics and phytoplankton on predation rates of the omnivorous copepods *Epischura lacustris* and *Epischura nordenskioldi* // *Limnology and Oceanography*. 1989. Vol. 34, №2. P. 444–450.

178. Schnack S.B., The structure of the mouth parts of copepods in Kiel Bay // *Meeresforschungen*. 1982. Vol.2. P. 89–101.

179. Schwarz G. Estimating the dimension of a model // *The Annals of Statistics*. 1978. Vol. 6, № 2. P. 461–464.

- 180.** Shapiro S.S., Wilk M.B. An analysis of variance test for normality // *Biometrika*. 1965. Vol. 52, № 3. P. 591–611.
- 181.** Slatkin M., Hudson R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations // *Genetics*. 1991. Vol. 129. P. 555–562.
- 182.** Sługocki L. Variability of mandible shape in the freshwater glacial relict *Eurytemora lacustris* (Poppe, 1887) (Copepoda, Calanoida, Temoridae) // *Crustaceana*. 2019. Vol. 93, № 3–5. P. 337–353.
- 183.** Sneath P.H.A., Sokal R.R. *Numerical taxonomy* // Freeman Press, San Francisco, 1973. 573 p.
- 184.** Strasburg J.L., Kearney M., Moritz C., Templeton A.R., Combining phylogeography with distribution modeling: Multiple Pleistocene range expansions in a parthenogenetic gecko from the Australian arid zone // *PLoS ONE*. 2007. Vol. 2, № 8:e760. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000760>
- 185.** Strickler J.R., Bal A.K. Setae of the first antennae of the copepod *Cyclops scutifer* (Sars): their structure and importance // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1973. Vol. 70. P. 2656–2659.
- 186.** Sukhikh N., Souissi A., Souissi S., Winkler G., Castric V., Holl A., Alekseev V. Genetic and morphological heterogeneity among populations of *Eurytemora affinis* (Crustacea: Copepoda: Temoridae) in European waters // *Comptes Rendus Biologies*. 2016. Vol. 339. P. 197–206.
- 187.** Sullivan B.K., Miller C.B., Peterson W.T., Soeldner A.H. A scanning electron microscope study of the mandibular morphology of boreal copepods // *Marine Biology*. 1975. Vol. 30. P. 175–182.
- 188.** Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations // *Genetics*. 1983. Vol. 105, № 2. P. 437–460.
- 189.** Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. Vol. 123. P. 585–595.

190.Tajima F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites // *Genetics*. 1996. Vol. 143, №3. P. 1457–1465.

191.Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition–transversion and G+C content biases // *Molecular Biology and Evolution*. 1992. Vol. 9. P. 678–687.

192.Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human mitochondrial humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. Vol. 10. P. 512–526.

193.Tamura K., Strecher G., Peterson D., Fillipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.

194.Turner J.T. Scanning electron microscope investigations of feeding habits and mouthpart structures of three species of copepods of the family Pontellidae // *Bulletin of Marine Sciences*. 1978. Vol. 28. P. 487–500.

195.Van Dongen S. How repeatable is the estimation of developmental stability by fluctuating asymmetry? // *Proceedings of the Royal Society B*. 1998. Vol. 265. P. 1423–1427.

196.Vanderploeg H.A., Paffenhofer G.A. Modes of algal capture by the freshwater copepod *Diaptomus sicilis* and their relation to food-size selection // *Limnology and Oceanography*. 1985. Vol. 30, №4. P.871–885.

197.Walter T.C., Boxshall G. (2018). World of Copepods database. Temoridae Giesbrecht, 1893. Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=104106> on 2018-05-17

198.Watterson G.A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination // *Theoretical population biology*. 1975. Vol. 7, №2. P. 256–276.

199.Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // *Evolution*. 1984. Vol. 38. P. 1358–1370.

200.Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis // Springer-Verlag New York, 2009. 276p.

201.Winkler G., Souissi S., Poux C., Castric V. Genetic heterogeneity among *Eurytemora affinis* populations in Western Europe // Marine Biology. 2011. Vol.158. P. 1841– 1856.

202.Wright S. Evolution and the genetics of populations // Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, 1978. Vol. 4. 75p.

203.Xia X., Xie Z., Salemi M., Chen L., Wang Y. An index of substitution saturation and its application // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003. Vol. 26, №1. P. 1–7.

204.Xia X., Lemey P. Assessing substitution saturation with DAMBE // Lemey P., Salemi M., Vandamme A.M., (Eds.), The phylogenetic handbook. Cambridge University Press, Cambridge, 2009. P. 615–630.

205.Yang Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods // Journal of Molecular Evolution. 1994. Vol. 39. P. 306–314.

206.Zagoskin M., Lazareva V., Grishanin A., Mukha D. Phylogenetic Information Content of Copepoda Ribosomal DNA Repeat Units: ITS1 and ITS2 Impact // BioMed Research International. 2014. №926342, 15p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/926342>

207.Zaidykov I., Bukin Y., Naumova E., Kirilchik S., Sukhanova L. Phylogenetic relationships and historical population reconstruction of Asian members of the genus *Epischura* (Copepoda, Calanoida) // Journal of Great Lakes Research. 2020. V. 46, № 1. P. 12–16.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ I. Число пор в сегментах цефалона и показатели флуктуирующей асимметрии, особей из южного Байкала.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений

ЮГ												
№ Образца	ТОРАКАЛЬНЫЙ					СОЕДИНИТЕЛЬНЫЙ					ОА	Fa
	ТЛБ	ТЛС	ЦТ	ТПС	ТПБ	СЛБ	СЛС	ЦС	СПС	СПБ		
1	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	0,00	0,00
2	1	0	2	0	1	1	2	0	3	1	-1,00	0,25
3	1	0	4	0	1	1	2	0	1	1	1,00	0,25
4	1	0	1	0	1	1	1	0	2	1	-1,00	0,25
5	2	0	2	0	1	1	1	0	1	2	0,00	0,50
6	1	1	2	0	1	1	2	0	1	1	2,00	0,50
7	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	0,00	0,00
8	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0,00	0,00
9	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
10	2	0	2	0	3	1	0	0	1	1	-2,00	0,50
11	0	0	4	0	0	0	1	0	1	0	0,00	0,00
12	2	0	4	0	2	2	1	0	1	2	0,00	0,00
13	1	0	4	2	2	1	1	0	1	1	-3,00	0,50
14	1	0	4	0	0	1	2	0	2	1	1,00	0,25
15	1	2	2	2	1	2	2	0	1	3	0,00	0,50
16	1	0	3	0	2	4	2	0	1	3	1,00	0,75
17	1	0	3	0	3	1	1	0	2	1	-3,00	0,50
18	1	1	4	0	1	1	2	0	3	1	0,00	0,50
19	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	0,00	0,00
20	2	0	5	0	3	5	5	0	5	1	3,00	0,50
21	1	0	4	0	1	1	3	0	3	1	0,00	0,00
22	2	0	3	0	2	3	3	0	1	1	4,00	0,50
23	0	3	2	0	2	1	3	0	1	0	4,00	1,00

24	0	0	2	0	2	1	1	0	1	1	-2,00	0,25
25	0	0	4	2	1	1	1	0	2	1	-4,00	0,75
26	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	-2,00	0,50
27	2	0	4	0	0	1	2	0	1	1	3,00	0,50
МИН	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-4,00	0,00
МАКС	2	3	5	2	3	5	5	0	5	3	4,00	1,00
СР	1	0	3	0	1	1	2	0	1	1	0,04	0,34

ПРИЛОЖЕНИЕ II. Число пор в сегментах цефалона и показатели флуктуирующей асимметрии, особей из северного Байкала.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений

СЕВЕР												
№Образца	ТОРАКАЛЬНЫЙ					СОЕДИНИТЕЛЬНЫЙ					ОА	Fa
	ТЛБ	ТЛС	ЦТ	ТПС	ТПБ	СЛБ	СЛС	ЦС	СПС	СПБ		
1	2	0	5	1	2	2	1	0	4	3	-5,00	0,75
2	0	0	8	0	0	1	1	0	1	2	-1,00	0,25
3	0	0	2	0	0	2	1	0	1	3	-1,00	0,25
4	1	0	2	0	1	2	2	2	1	1	2,00	0,50
5	2	0	2	0	1	2	1	0	3	4	-3,00	0,75
6	0	1	2	1	0	0	1	0	1	0	0,00	0,00
7	1	4	4	3	1	1	1	0	1	1	1,00	0,25
8	1	3	3	3	1	3	5	0	1	3	4,00	0,25
9	2	2	2	2	2	1	1	0	1	1	0,00	0,00
10	1	2	2	4	1	0	2	0	2	2	-4,00	0,50
11	1	3	2	3	1	2	1	0	1	0	2,00	0,25
12	1	0	4	0	1	0	1	0	1	1	-1,00	0,25
13	2	2	4	0	1	2	1	0	1	1	4,00	0,75
14	0	0	2	0	1	0	1	1	2	2	-4,00	0,75
15	1	0	2	0	1	1	1	0	2	2	-2,00	0,50
16	1	0	3	0	2	1	1	0	2	2	-3,00	0,75
17	1	0	2	0	0	0	1	0	1	1	0,00	0,50
18	1	0	4	0	3	2	2	0	3	1	-2,00	0,75
19	1	0	2	0	1	1	2	0	3	1	-1,00	0,25
20	1	0	4	0	1	1	2	0	2	1	0,00	0,00
21	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	0,00	0,00
22	2	0	4	0	2	1	1	0	2	1	-1,00	0,25
23	1	0	2	0	1	1	3	0	2	2	0,00	0,50

24	1	0	2	0	1	0	2	0	4	2	-4,00	0,50
25	1	0	4	0	1	0	2	0	2	2	-2,00	0,25
26	1	0	2	0	1	2	2	0	2	0	1,00	0,25
27	2	0	4	0	2	2	2	0	4	1	-1,00	0,50
28	3	0	4	0	1	1	3	0	1	0	5,00	0,75
29	3	0	2	2	1	1	3	1	4	1	-1,00	1,00
МИН	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	-5,00	0,00
МАКС	3	4	8	4	3	3	5	2	4	4	5,00	1,00
СР	1	1	3	1	1	1	2	0	2	1	-0,59	0,42

ПРИЛОЖЕНИЕ III. Результаты теста Шапиро-Уилка на нормальность распределения числа структур на сегментах цефалона.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений

Выборка	Участок цефалона	W	p-value	Нормальное распределение
Юг	СПБ	0,71693	0,00	Нет
	СПС	0,69156	0,00	Нет
	СЛБ	0,68241	0,00	Нет
	СЛС	0,82926	0,00	Нет
	ТПБ	0,86681	0,00	Нет
	ТПС	0,36809	0,00	Нет
	ТЛБ	0,79055	0,00	Нет
	ТЛС	0,42801	0,00	Нет
	ТЦ	0,84806,	0,00	Нет
	ЦС	Нет	Нет	Нет
	Общее	0,91238	0,03	Нет
	Общее (без выбросов)	0,9639	0,47	Да
Север	СПБ	0,88559	0,00	Нет
	СПС	0,78702	0,00	Нет
	СЛБ	0,86049	0,00	Нет
	СЛС	0,70739	0,00	Нет
	ТПБ	0,78445	0,00	Нет
	ТПС	0,60617	0,00	Нет
	ТЛБ	0,8249	0,00	Нет
	ТЛС	0,57667	0,00	Нет

	ТЦ	0,7057	0,00	Нет
	ЦС	0,3579	0,00	Нет
	Общее	0,97136	0,60	Да
	Общее (без выбросов)	0,97036	0,61	Да

ПРИЛОЖЕНИЕ IV. Результаты теста Шапиро-Уилка на нормальность распределения асимметрии.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений.

Выборка	Район	W	p-value	Нормальность распределения
Юг	ТБ	0,86	0,00	Нет
	ТС	0,58	0,00	Нет
	СБ	0,60	0,00	Нет
	СС	0,85	0,00	Нет
	ОА	0,94	0,10	Да
	Fa	0,86	0,00	Нет
Север	ТБ	0,73	0,00	Нет
	ТС	0,58	0,00	Нет
	СБ	0,92	0,03	Нет
	СС	0,86	0,00	Нет
	ОА	0,95	0,24	Да
	Fa	0,90	0,01	Нет

ПРИЛОЖЕНИЕ V. Результаты статистического сравнения между собой районов
цефалона слева и справа по числу структур.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений.

U-тест Уилкоксона – Манна – Уитни				
Выборка	Параметр	W	P-value	Стат. знач. отличие
Юг	ТБ	428	0,23	нет
	ТС	352,5	0,73	нет
	СБ	350	0,77	нет
	СС	330	0,51	нет
	Общий	342,5	0,71	нет
Север	ТБ	393,5	0,63	нет
	ТС	434,5	0,78	нет
	СБ	485,5	0,29	нет
	СС	480	0,32	нет
	Общий	349,5	0,27	нет

ПРИЛОЖЕНИЕ VI. Результаты статистического сравнения между собой районов цефалона слева и справа по числу структур. Значения эксцесса для распределения показателей асимметрии между районами цефалона.

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений.

	Район	N	Экс.	Экс. Крит ($\alpha=0,05$)
Юг	ТБ	27	0,84	0,87
	ТС	27	6,94	0,87
	СБ	27	9,59	0,87
	СС	27	0,17	0,87
	Общее	27	0,05	0,87
Север	ТБ	29	2,92	0,85
	ТС	29	5,35	0,85
	СБ	29	-0,63	0,85
	СС	29	3,49	0,85
	Общее	29	0,17	0,85

ПРИЛОЖЕНИЕ VII. Результаты статистического сравнения выборок юга и севера

Таблица. Условные обозначения смотреть список сокращений.

F-тест Фишера				
Параметр		F	P-value	Диперсии равны
ОА		0,68	0,32	Да
Общее количество структур (без выбросов)		0,89	0,77	Да
T-тест Стьюдента				
Параметр		T	P-value	Стат, знач, отличие
ОА		1,04	0,30	Нет
Общее количество структур (без выбросов)		1,82	0,07	Нет
U-тест Уилкоксона - Манна - Уитни				
Параметр		W	P-value	Стат, знач, отличие
Fa		331	0,31	нет
Количество структур	ТЛБ	354	0,49	нет
	ТЛС	349,5	0,33	нет
	ТПС	324	0,11	нет
	ТПБ	447,5	0,31	нет
	СПБ	302,5	0,11	нет
	СПС	286,5	0,06	нет
	СЛС	376	0,79	нет
	СЛБ	381,5	0,86	нет
	ЦТ	391,5	1	нет
	ЦС	432	0,09	нет
	Общее	283	0,07	нет

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII Результаты измерений длины тела и ротовых конечностей двух видов рода *Epischura* (\pm SD(N), где N – число измерений, SD- стандартное отклонение).

Таблица.

Название объекта, единица измерения	<i>E. baikalensis</i>	<i>E. chankensis</i>
Длина тела, мкм	1184 \pm 84,1(30)	864 \pm 60,2(25)
Длина вторых антенн, мкм	230,2 \pm 36,9 (10)	176,2 \pm 32,8 (10)
Длина сет вторых антенн, мкм	261,1 \pm 68,9(10)	198 \pm 67(10)
Длина пальпы мандибулы, мкм	170,5 \pm 18,2(10)	80,5 \pm 15,1 (10)
Длина сет пальпы мандибулы, мкм	263,1 \pm 70,2(10)	111,8 \pm 40,4 (10)
Длина первой максиллы Mx1, мкм	144,5 \pm 21,3 (30)	69,7 \pm 16,1 (25)
Длина сет первой максиллы Mx1, мкм	230,7 \pm 35,2 (25)	94,8 \pm 40,2 (25)
Диаметр сет первой максиллы Mx1, мкм	2,4 \pm 1,3 (180)	1,7 \pm 0,7 (180)
Длина сетул первой максиллы Mx1, мкм	10,9 \pm 2,3 (37)	12,7 \pm 2,3 (25)
Диаметр сетул первой максиллы Mx1, мкм	0,29 \pm 0,06(25)	0,29 \pm 0,08 (112)
Расстояние между сетулами первой максиллы Mx1, мкм	1,03 \pm 0,3 (102)	0,34 \pm 0,18 (106)
Длина второй максиллы Mx2, мкм	165,8 \pm 21,3 (5)	98,7 \pm 11,3 (4)
Длина сет второй максиллы Mx2, мкм	181,5 \pm 41,1(40)	83,0 \pm 17,8 (31)
Диаметр сет второй максиллы Mx2, мкм	3,57 \pm 0,78 (150)	3,15 \pm 1,1 (150)
Расстояние между сетами второй	20,9 \pm 8,7 (25)	8,6 \pm 3,3 (20)

максиллы Мх2, мкм		
Длина сетул второй максиллы Мх2, мкм	10,7±2,6 (150)	7,9±2,4 (120)
Расстояние между сетулами второй максиллы Мх2, мкм	9,1±2,7 (100)	3,2 ±0,7 (120)
Площадь F ₃ для Мх1, мкм ²	66 470	13 215
Площадь F ₃ для Мх2, мкм ²	30 089	17 572